

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Desenvolvimento de um biossensor enzimático para a deteção de cianetos em águas e alimentos

Ana Rita de Sousa Coelho

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Doutora Ana Viana
Doutora Maria Gabriela Almeida

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço às professoras Doutora Ana Viana e Doutora Maria Gabriela Almeida, pela oportunidade em realizar a dissertação sobre a sua orientação. Gostaria também de agradecer, o apoio dado, conselhos e conhecimentos transmitidos durante o projeto, os quais me permitiram evoluir pessoal e profissionalmente.

Agradeço também ao mestre Tiago Monteiro e Doutora Célia Silveira por toda a disponibilidade, paciência e apoio. Ao grupo de eletroquímica interfacial e Doutora Ana Mourato, obrigada por toda a simpatia e colaboração.

Em especial, quero agradecer aos meus pais e avós por me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos e por sempre puxarem pelo melhor de mim.

Ao meu irmão, Diogo, agradeço do fundo do coração toda a força, compreensão, paciência e companheirismo.

A todos os amigos que me acompanham, muito obrigada.

Resumo

O cianeto que é um agente poluente de ação tóxica e rápida, presente no meio ambiente devido à sua vasta utilização na indústria química. Os biossensores de inibição podem ser implementados para a quantificação deste composto em águas e alimentos. Assim, neste trabalho foi realizado um estudo preliminar para o desenvolvimento de um novo biossensor enzimático para cianetos, recorrendo a técnicas eletroquímicas, nomeadamente a voltametria cíclica (CV) e a voltametria de onda quadrada (SWV). Este biossensor baseia-se na inibição da enzima multihémica, redutase do nitrito (ccNiR) imobilizada na superfície de minas de grafite comercial, permitindo obter um sistema de monitorização de baixo custo. Para tal, foram escolhidas e caracterizadas quatro minas de grafite comercial como materiais transdutores: uma mina HB marca BIC (HBBICPE) e 3 minas 3B (3BKOHPE), HB (HBKOHPE) e 3H (3HKOHPE) da marca KOH-I-NOOR.

Na caracterização dos quatro elétrodos de minas de grafite comercial verificou-se que as minas comerciais são constituídas por grafite natural e pelo mineral argiloso caulim. O desempenho eletroquímico de todas as minas em estudo para o processo de oxidação e redução do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ foi avaliado por voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Verificou-se que o elétrodo HBBICPE permitiu uma transferência eletrónica mais eficaz do par redox estudado, por ter apresentado uma separação entre os processos redox (ΔE_p) e valores de resistência à transferência de carga (R_{ct}) inferiores aos dos outros elétrodos de minas propostos. Deste modo, modificou-se mina HB da BIC com a enzima ccNiR, observando-se pela primeira vez uma transferência eletrónica direta entre a enzima e o elétrodo para a redução catalítica do nitrito, validando a utilização de um elétrodo de muito baixo custo.

Por voltametria de onda quadrada e na presença de 40 μM de nitrito, é possível obter um intervalo linear para a quantificação de cianeto entre 1 a 40 μM , com um limite de deteção inferior a 1 μM , recorrendo a dois métodos distintos para a remoção do oxigénio dissolvido. Com o sistema de desarejamento mais usual da célula eletroquímica pelo gás árgon, obtém-se uma sensibilidade de $17,6 \pm 0,7 \%$ enquanto que com um sistema bioquímico de duas enzimas, glucose oxidase (GOx) e a catalase, obtém-se uma sensibilidade ligeiramente superior ($20,1 \pm 0,6 \%$). Estes resultados provam a aplicabilidade do sistema desenvolvido para análises no local de recolha, onde não é possível recorrer a um desarejamento com um gás inerte. Além disso, foi demonstrado neste trabalho que é possível obter uma boa reprodutibilidade no valor do potencial do pico de redução da enzima ao substituir a referência convencional de Ag/AgCl pelo elétrodo HBBICPE. Utilizando o sistema de elétrodos (trabalho e pseudo-referência) composto pelas minas comerciais, os parâmetros do biossensor, ao nível da sensibilidade, limite de deteção e intervalo de linearidade não apresentam alterações significativas.

Palavras-chave: Biossensor, redutase do nitrito do citocromo c, minas de grafite comercial, voltametria de onda quadrada

Abstract

Cyanide is a pollutant and toxic agent. It is present in the environment due to its wide range of applications in chemical industry. Inhibition based biosensors can be suitable for cyanide quantification in water and food. Thereby, in this work it was made a preliminary study to develop a new enzymatic biosensor for cyanides, with electrochemical techniques for signal transducer, like cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV). This biosensor is based on the inhibition of a multihemic enzyme, the nitrite reductase (ccNiR), immobilized on the surface of commercial graphite mines, which allowed a low-cost monitorization system. For that, it was chosen and characterized four graphite mines as transducers: one HB mine from BIC and mines 3B (3BKOHPE), HB (HBKOHPE) and 3H (3HKOHPE) from KOH-I-NOOR.

In the characterization of these four graphite mine electrodes we found that all mines are made of natural graphite, and kaolin clay mineral. The electrochemical behaviour of all mine electrodes for oxidation and reduction of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ probe were evaluated by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). It was shown that HBBICPE electrode had a better heterogenous electron transfer, since the peak separation of redox process (ΔE_p) and charge resistance transfer (R_{ct}) values were inferior to the obtained for the other mine electrodes in the study. This way, HBBICPE was modified with ccNiR enzyme and, for the first time, a direct electron transfer for the catalytic nitrite reduction between the enzyme and the mine electrode was seen, validating the use of this low-cost electrode.

By square wave voltammetry, in the presence of 40 μM nitrite, a linear range for cyanide quantification between 1 to 40 μM was acquired, with a detection limit less than 1 μM . These was archived with two distinct methods to remove dissolved oxygen. When the electrochemical cell was purged with argon gas, the sensitivity obtained for the biosensor was $17,6 \pm 0,7 \%$, whereas using a biochemical system, with glucose oxidase (GOx) and catalase, the sensitivity was slightly higher ($20,1 \pm 0,6 \%$). These results demonstrated that the developed system can be applied for *in situ* analysis. Furthermore, it was shown that a good reproducibility of the value of peak enzyme reduction potential can be obtained, when replacing the conventional Ag/AgCl reference by HBBICPE electrode. Using the graphite mine electrode (working and pseudo-reference) system the biosensor settings, in respect to sensibility, detection limit and linear range didn't change significantly.

Keywords: Biosensor, cytochrome *c* nitrite reductase, commercial graphite mine, square wave voltammetry

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de tabelas	vii
Lista de figuras	viii
Lista Abreviaturas.....	xi
Lista de símbolos	xii
Capítulo 1.....	1
1. Introdução teórica.....	3
1.1. Biossensores enzimáticos eletroquímicos	3
1.1.1. Enzimas como componente biológico.....	3
1.1.2. Transdutores eletroquímicos	8
1.2. Cianeto	10
1.2.1. Ocorrência e toxicidade.....	10
1.2.2. Métodos de detecção.....	11
1.2.3. Outras abordagens: biossensores.....	12
1.3. Redutase do nitrito	13
1.3.1. Biossensores para a detecção de nitrito.....	14
1.4. Objetivos e organização da dissertação.....	16
Capítulo 2.....	18
2. Procedimentos e métodos experimentais	20
2.1. Materiais e reagentes	20
2.2. Técnicas eletroquímicas	21
2.2.1. Célula e elétrodos	21
2.2.2. Voltametria cíclica e de onda quadrada	23
2.2.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica	26
2.3. Microscopia de força atômica	28
2.4. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios X por dispersão de energia ...	29
2.5. Difração de raio X	30
Capítulo 3.....	33
3. Análise e discussão de resultados	35
3.1. Caracterização dos elétrodos de minas de grafite	35
3.1.1. Estrutura e composição	35
3.1.2. Desempenho da grafite como material de eletrodo	38
3.1.3. Imobilização da enzima ccNiR	42
3.2. Desempenho do biossensor para a detecção de nitrito	44
3.2.1. Eletrodo de grafite pirolítica modificado com a enzima ccNiR.....	44
3.2.2. Elétrodos de minas modificados com a enzima ccNiR	46
3.3. Desempenho do biossensor para detecção de cianeto	48
3.3.1. Quantificação de cianeto por voltametria de onda quadrada utilizando um sistema bioquímico para a remoção do oxigênio	51

Capítulo 4.....	57
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	59
5. Referências	61
6. Anexos	68
Anexo A: Circuitos AC – conceito de impedância	68
Anexo B: Dados experimentais obtidos por EIS para uma grafite policristalina	71
Anexo C: Resultados obtidos para o ajuste não linear do perfil de inibição	72

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Parâmetros cinéticos que são afetados pela presença do inibidor ao comparar com resultados da atividade catalítica apenas na presença do substrato – adaptado da referência (12).	7
Tabela 1.2: Biossensores enzimáticos amperométricos para a detecção do cianeto.	13
Tabela 2.1: Composição das soluções tampão utilizadas para a caracterização das minas de grafite e no estudo da resposta do biossensor para nitrito e cianeto.	21
Tabela 3.1: Composição e valores da percentagem em massa de cada elemento presente nas minas de grafite comerciais, obtida pela análise de uma área da superfície por EDS.	36
Tabela 3.2: Valores de ΔE_p observados por voltametria cíclica e valores aproximados de resistência à transferência de carga obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica, dos elétrodos de mina de grafite comercial, com respectivo erro do ajuste dos dados obtidos ao circuito equivalente.	41
Tabela 3.3: Valores da resistência à transferência de carga obtidos para dois polimentos dos elétrodos HBBICPE em estudo, e respectivo erro do ajuste ao circuito (b) da figura 3.2.	42
Tabela 3.4: Comparação entre os elétrodos PGE e HBBICPE. Valores obtidos para a constante de Michaelis-Menten, sensibilidade do biossensor, assim como coeficiente de correlação da reta de calibração e respectivo intervalo de linearidade (IL).	48
Tabela 3.5: Comparação entre as várias técnicas eletroquímicas utilizadas a diferentes concentrações de substrato. Valores obtidos para a sensibilidade do biossensor, assim como os respectivos coeficientes de correlação da reta de calibração, intervalo de linearidade (IL) e limite de detecção estimado (LOD). ..	53
Tabela 3.6: Comparação entre os diferentes elétrodos de minas utilizados como pseudo-referências, para uma concentração de nitrito de 40 μM . Valores obtidos para a sensibilidade do biossensor, assim como os respectivos coeficientes de correlação das retas de calibração e limite de detecção (LOD).	55

Lista de figuras

Figura 1.1: Esquema simples dos constituintes de um biossensor – adaptado da referência (1).	3
Figura 1.2: Velocidade da reação em função da concentração de substrato, curva de Michaelis-Menten - adaptado da referência (11).....	5
Figura 1.3: Mecanismo de reação entre a enzima e o respetivo substrato na presença de um inibidor da atividade catalítica. Inibição irreversível (a) e inibição reversível competitiva (b) ou não competitiva (c) – adaptado da referência (14).	6
Figura 1.4: Estratégias para a imobilização de enzimas na superfície de um transdutor - adaptado da referência (3).	7
Figura 1.5: Resposta de diferentes gerações de biossensores amperométricos enzimáticos. (a) corresponde à primeira geração de biossensores onde o co-substrato é utilizado como indicador redox, (b) corresponde à segunda geração de biossensores onde um mediador redox artificial é usado para fazer a troca de eletrões e (c) que corresponde à terceira geração de biossensores onde existe transferência eletrónica direta entre a enzima e o elétrodo.	9
Figura 1.6: Estrutura química dos compostos cianogénicos presentes na mandioca: Limarina (a) e lotaustralina (b)	10
Figura 1.7: Estrutura da subunidade catalítica da redutase do nitrito do citocromo <i>c</i> obtida a partir da bactéria <i>D. desulfuricans</i> : estrutura do dímero (a) , arranjo dos grupos hémicos e localização dos catiões cálcio (b) - adaptada da referência (57).....	14
Figura 1.8: Transferência eletrónica para os biossensores amperométricos enzimáticos para a deteção de nitrito: utilização de mediador e transferência eletrónica direta.....	15
Figura 2.2: Materiais utilizados para a construção dos elétrodos de grafite (a) : fio de cobre para o contacto elétrico (1) , seringa para o suporte da mina de grafite (2) , mina de grafite comercial (3) e duas mangas termo retrateis (4) . Exemplo de um elétrodo de trabalho (b) e de um elétrodo de referência de minas de grafite (c)	22
Figura 2.3: Movimento em oito para o polimento dos elétrodos de grafite comercial e de grafite pirolítica – adaptado da referência (68).	23
Figura 2.4: Variação do potencial em função do tempo (a) e voltamograma cíclico da redução e oxidação de uma espécie eletroativa, Fc^+/Fc (b) - adaptado da referência (68).	23
Figura 2.5: Forma da onda na voltametria de onda quadrada e respetivos parâmetros – adaptado da referência (19)	24
Figura 2.6: Voltamogramas obtidos por voltametria de onda quadrada, para um sistema reversível. Voltamogramas no sentido direto (corrente catódica), no sentido inverso (corrente anódica) e a diferença entre as duas correntes - adaptada da referência (69).	25
Figura 2.7: Diagrama de Nyquist (a) e correspondente circuito equivalente de Randles (b)	27
Figura 2.8: Princípios do funcionamento de um microscópio de força atómica - adaptado da referência (79).	28

Figura 2.9. SEM/EDS do MicroLab <i>Electron microscopy laboratory</i> do Instituto Superior Técnico de Lisboa.	30
Figura 2.10: Difração de raios X dos planos de uma rede cristalina - adaptado da referência (85).....	31
Figura 3.1: Imagem obtidas por SEM com uma ampliação de 1000 para os elétrodos de minas propostos: HBBICPE (a), HBKOHPE (b), 3BKOHPE (c) e 3HKOHPE (d).....	35
Figura 3.2: Espectro de dispersão de raios X das minas comerciais (a) e respetiva ampliação do espectro (b).	37
Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos do sistema com 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$, dos elétrodos de minas de grafite comerciais ($A = 0,0314 \text{ cm}^2$), em tampão tris-HCl 0,1M (pH = 7,6) e KCl 0,1 M, a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s. (a) comparação entre os quatro tipos de elétrodos e (b) Triplicados do elétrodo HBBICPE.	38
Figura 3.4: Resultados obtidos por EIS: (c) Diagrama de Nyquist dos elétrodos em estudo, para uma frequência de 1×10^5 a 0,005 Hz, no potencial de equilíbrio 0,2 V, em tris-HCl 0,1 M (pH = 7,6), KCl 0,1 M e 1 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$. (d) circuito equivalente proposto para os elétrodos HBBICPE, 3BKOHPE e HBKOHPE; (e) circuito equivalente proposto para o elétrodo 3HKOHPE.	40
Figura 3.5: Diagramas de Nyquist, em tris-HCl 0,1M (pH=7,6), KCl 0,1M e 1 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$, para dois elétrodos HBBICPE, polidos duas vezes. A linha contínua representa o primeiro polimento (HBBICPE/1) e a linha descontínua representa o segundo polimento do elétrodo (HBBICPE/2). Ensaio realizado com uma frequência de 1×10^5 a 0,01 Hz, no potencial de equilíbrio 0,2 V.	42
Figura 3.6: Imagens topográficas obtidas por AFM para a mina HB da BIC sem enzima (a) e modificada com a ccNiR (b) e HB Koh-I-Noor sem enzima (c) e modificada com a ccNiR (d) e (e).	43
Figura 3.7: Imagens topográficas obtidas por AFM das minas HB da BIC (a) e KOH-I-NOOR (b) modificadas com enzima após lavagem com tampão 0,1 M Tris-HCl e KCl 0,1 M, pH=7,6.	43
Figura 3.8: Diagrama de Nyquist do elétrodo HBBICPE antes e após a modificação com a enzima ccNiR. Frequência de 1×10^5 a 0,005 Hz e amplitude de 10 mV, no potencial de equilíbrio 0,2 V, em tris-HCl 0,1 M (pH=7,6), KCl 0,1 M e 1 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$	44
Figura 3.9: (a) Voltamogramas cíclicos obtidos para a enzima ccNiR (3,75 μg) imobilizada na superfície do elétrodo PGE <i>edge</i> . Concentrações de nitrito compreendidas entre 0,10 μM a 102 μM . Varrimento do potencial de - 0,1 a - 0,8 V com uma velocidade de 20 mV/s. Célula eletroquímica desarejada com árgon; (b) Perfil cinético de Michaelis-Menten da enzima ccNiR, entre 0,10 a 1070 μM de nitrito; Resultados obtidos duplicado. A partir dos dados experimentais ajustados para curva hiperbólica com $-j_{cat} = (82 \times [NO_2^-]) / (94 + [NO_2^-])$ e $R^2 = 0,991$; (c) Curva de calibração para a quantificação do nitrito compreendida entre 1 a 102 μM de nitrito; $-j_{cat} = 0,43[NO_2^-] + 2,3$, com $R^2 = 0,997$	45
Figura 3.10: Voltamogramas cíclicos obtidos, com o elétrodo de trabalho modificado com a ccNiR, para uma concentração de nitrito de 40 μM . Varrimento do potencial entre - 0,1 a - 0,8 V com uma velocidade de varrimento de 20 mV/s. (a) comparação entre os elétrodos de minas de grafite modificados com 2,25 μg da enzima ccNiR e (b) comparação de um PGE (modificado com 3,75 μg de enzima) com o HBBICPE.	47

Figura 3.11: (a) Voltamogramas cíclicos obtidos da redução da enzima ccNiR (2,25 µg) imobilizada no elétrodo HBBICPE. Adições sucessivas de nitrito de 1 a 475 µM, velocidade de varrimento 20 mV/s. Célula eletroquímica desarejada com árgon. (b) Perfil de Michaelis-Menten para a atividade enzimática obtida a partir modificação dos elétrodos de minas, em triplicado, entre 1 a 846 µM de nitrito; $|j_{cat}| = (676 \times [NO_2^-]) / (652 + [NO_2^-])$. (c) Curva de calibração para a quantificação do nitrito, com um intervalo de linearidade entre 1 a 40 µM. Equação da reta: $-j_{cat} = 1,18[NO_2^-] + 1,4$, $R^2 = 0,999$48

Figura 3.12: Esquema generalizado para a inibição da enzima ccNiR pelo cianeto, considerando a sua afinidade maior para o estado reduzido da enzima.49

Figura 3.13: Voltamogramas cíclicos obtidos Elétrodo HBBICPE modificado com 2,25 µg da enzima ccNiR, entre -0,1 V a -0,8 V e com uma velocidade de varrimento de 20mV/s. O eletrólito de suporte foi o tampão Tris-HCl e KCl 0,1M, pH=7,6. Desarejamento da célula com árgon. Ensaios referentes a quatro concentrações de nitrito diferentes (sem cianeto) (a) e para uma concentração de nitrito de 40 µM, na presença de cianeto entre 1 µM a 475 µM (b). Perfil de inibição para as quatro concentrações de nitrito em estudo, (c). Curvas de calibração para a quantificação de cianeto entre 1 µM a 40 µM, na presença de 10 µM ($\Delta j_{inibição} = 25 \ln[CN^-] - 27$; $R^2 = 0,982$), 20 µM ($\Delta j_{inibição} = 23,8 \ln[CN^-] - 19$; $R^2 = 0,999$) e 40 µM ($\Delta j_{inibição} = 23 \ln[CN^-] - 20$; $R^2 = 0,994$) de nitrito, (d).50

Figura 3.14: Voltamogramas cíclicos referentes aos elétrodos de minas modificados com a enzima ccNiR, antes da adição de nitrito. Velocidade de varrimento de 20 mV/s, para um potencial entre - 0,1 a - 0,8 V, em Tampão Tris-HCl e KCl 0,1M, pH = 7,6. Oxigénio dissolvido removido pelo desarejamento da célula com o gás árgon.51

Figura 3.15: (a) voltamogramas obtidos por voltametria de onda quadrada, corrigidos para a linha de base pelo programa *Qsoas*. Amplitude de 0,02 V e frequência de 10 Hz. Adição de cianeto de 1 a 150 µM e remoção do oxigénio pelo sistema bioquímico (GOx, catalase; glucose). (b) Perfil de inibição da enzima ccNiR, com o desarejamento efetuado com árgon e com o sistema bioquímico entre 1 a 150 µM de cianeto, na presença de 40 µM de nitrito. (c) Voltamogramas cíclicos do elétrodo HBBICPE não modificado, com uma velocidade de varrimento de 20 mV/s. Adições de cianeto sem nitrito e remoção do oxigénio com o sistema bioquímico. (d) Intervalo de linearidade para a quantificação de cianeto entre a 1 µM a 40 µM, na presença de 40 µM de nitrito para os dois métodos de remoção de oxigénio. Potencial varrido entre - 0,1 a - 0,8 V.53

Figura 3.16: Potencial do pico catódico em função da concentração de cianeto, obtido por voltametria de onda quadrada. Adições de cianeto entre 1 µM a 40 µM (a). Intervalo de linearidade entre 1 µM a 40 µM para quantificação de cianeto com os elétrodos de minas como pseudo-referência. Resultados obtidos pela média de triplicados nos elétrodos HBBICPE com o elétrodo de referência Ag/AgCl e com os elétrodos de minas como pseudo-referências, na presença de 40 µM de nitrito. (b). O oxigénio foi removido pelo sistema bi-enzimático.55

Lista de abreviaturas

3BKOHPE	Eléttrodo de lápis preparado com a mina da 3B da KOH-I-NOOR
3HKOHPE	Eléttrodo de lápis preparado com a mina da 3H da KOH-I-NOOR
AFM	Microscopia de força atômica (do Inglês, <i>Atomic Force Microscopy</i>)
ccNiR	Nitrito redutase do citocromo <i>c</i>
CE	Contra eléttrodo (do Inglês, <i>counter electrode</i>)
CPE	Elemento de constante de fase
CV	Voltametria cíclica (do Inglês <i>cyclic voltametry</i>)
E	Enzima
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do Inglês, <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>)
EU	União Europeia (do Inglês, <i>European Union</i>)
FDH	Desidrogenase do formato
GCE	Eléttrodo de carbono vítreo (do Inglês, <i>glassy carbon electrode</i>)
GOx	Glucose oxidase
HBICPE	Eléttrodo de lápis preparado com a mina da HB da BIC
HBKOHPE	Eléttrodo de lápis preparado com a mina da HB da KOH-I-NOOR
HOPG	Eléttrodo de grafite altamente ordenada (do Inglês, <i>high oriented pyrolytic graphite</i>)
HRP	Peroxidase de rábano (do Inglês, <i>horseradish peroxidase</i>)
IL	Intervalo de linearidade
LOD	Limite de detecção
Med	Mediador
MTMOS	Metiltrimetoxisilano
ox	Oxidação
P	Produto da reação catalítica
PGE	eléttrodo de grafite pirolítica (do Inglês, <i>pyrolytic graphite electrode</i>)
PPO	Oxidase do polifenol
RE	Eléttrodo de referência (do Inglês, <i>reference electrode</i>)
red	Redução
S	Substrato
SBQ	Sistema bioquímico
SCE	Eléttrodo saturado de calomelanos (do Inglês, <i>Saturated Calomel Electrode</i>)
SWV	Voltametria de onda quadrada (do Inglês, <i>square wave voltametry</i>)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
WE	Eléttrodo de trabalho (do Inglês, <i>working electrode</i>)
XRD	Difração de raios X (do Inglês, <i>X-Ray Diffraction</i>)
<i>D. desulfuricans</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>S. onidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Lista de símbolos

A	Área do eletrodo
C	Capacitância
C_{dl}	Capacidade da dupla camada
c_z	Constante elástica de mola
E	Potencial
E_i	Potencial inicial
E_f	Potencial final
E_p^a	Potencial de pico anódico ou de oxidação
E_p^c	Potencial de pico catódico ou de redução
F	Força
f	Frequência
ω	Frequência angular
I	Corrente
i_{cat}	Corrente catalítica
i_{max}	Corrente máxima
i_p^a	Corrente no pico anódico
i_p^c	Corrente no pico catódico
i_d	Corrente no sentido direto
i_r	Corrente no sentido inverso
j	Densidade de corrente
j_i	Densidade de corrente na presença de inibidor
j_{cat}	Densidade de corrente catalítica
j_{max}	Densidade de corrente catalítica máxima
ΔE_p	Separação dos picos
ΔE	Incremento de potencial
Δi	Diferença de corrente
Δz	Deflexão do cantiléver
$\Delta j_{inibição}$	Porcentagem de inibição
k_1	constante de velocidade da reação no sentido direto
k_{-1}	constante de velocidade da reação no sentido inverso
k_{cat}	constante de velocidade catalítica
k_I	constante de inibição da enzima
k_{int}	constante de inativação da enzima
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_M^{App}	Constante de Michaelis-Menten aparente
K_d	Constante de dissociação
t	tempo
t_p	Largura do pico
λ	Comprimento de onda
v	Velocidade de varrimento do potencial
v_0	Velocidade de reação inicial
$v_{0,max}$	Velocidade da reação inicial máxima
R	Resistência
R_{ct}	Resistência à transferência de carga

R_s	Resistência da solução
τ	Período de um ciclo
θ	Ângulo
Z	Impedância
Z'	Componente real de impedância
Z''	Componente imaginária de impedância
Z_w	Impedância de Warburg
X_C	Reactância capacitiva

Capítulo 1:

Introdução

1. Introdução teórica

1.1. Biossensores enzimáticos eletroquímicos

Os sensores são dispositivos que registam uma alteração física, química ou biológica e a convertem num sinal mensurável. O sensor contém um elemento de reconhecimento, que permite a resposta seletiva a um analito ou a um grupo de analitos particulares, um transdutor e um processador do sinal¹. Os biossensores, que representam uma subclasse dos sensores, contêm um elemento de reconhecimento biológico em contacto próximo com um transdutor físico-químico (figura 1.1), que traduz o fenómeno de bio-reconhecimento num sinal eletrónico proporcional à concentração do analito^{2,3,4}. Estes elementos devem estar integrados numa mesma unidade, preferencialmente de pequenas dimensões⁴.

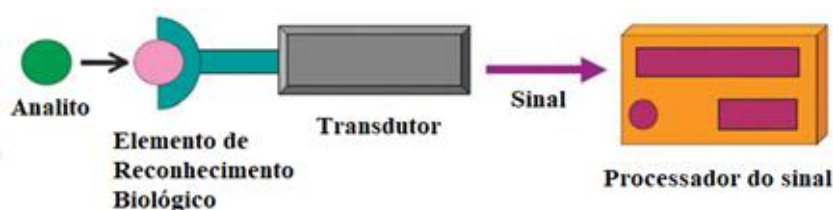


Figura 1.1: Esquema simples dos constituintes de um biossensor – adaptado da referência (1).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a natureza do elemento de reconhecimento biológico (enzimas, anticorpos, ácido nucleicos ou células), o modo de transdução do sinal (ótico, calorimétrico, piezoelétrico ou eletroquímico), ou pela combinação dos dois³. No caso de enzimas em que a reação com o substrato está associada a processos de transferência eletrónica, os métodos de transdução eletroquímicos são os mais adequados para a transdução do sinal. A combinação entre a seletividade e a sensibilidade das enzimas³ com a portabilidade e o baixo custo da instrumentação eletroquímica permite a produção em massa dos biossensores para análise de amostras complexas em tempo real e no próprio local^{1,3,5,6}. Em contrapartida, umas das dificuldades no desenvolvimento destes biossensores deve-se ao tempo de vida limitado do componente biológico⁷.

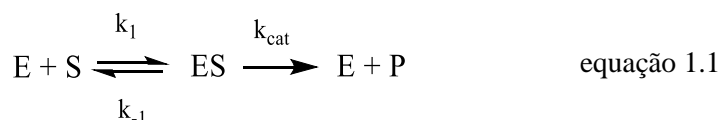
1.1.1. Enzimas como componente biológico

A principal vantagem das enzimas no desenvolvimento de biossensores é a sua seletividade para um analito particular, que representa o fator chave da seletividade do biossensor⁸. Este componente biológico pode, não só, quantificar os seus substratos, como também os seus inibidores. Do ponto de vista histórico, em 1962 assistiu-se a um dos maiores avanços na área da química analítica, nomeadamente o desenvolvimento do biossensor de glucose. Este biossensor foi desenvolvido pelos investigadores Clark e Lyons que imobilizaram a enzima glucose oxidase (GOx) na superfície de um eletrodo de oxigénio. Contudo, apenas dez anos mais tarde é que foi possível comercializar o produto desenvolvido com base nesta tecnologia (*Yellow Spring Instruments*). Depois disto, o conceito de eletrodos modificados com enzimas imobilizadas atraiu muita atenção, o que proporcionou a sua

expansão para a análise de outros analitos³, nomeadamente na quantificação de inibidores da atividade catalítica da enzima⁹. No mesmo ano em que foi proposto o biossensor de glucose Guilbault desenvolveu um biossensor para a deteção de agentes de nervos a partir da inibição da enzima colinesterase⁹, sendo esta uma das enzimas mais comuns no desenvolvimento de biossensores de inibição¹⁰.

Cinética enzimática

Apesar do estudo da cinética das reações catalisadas por enzimas ser um assunto complexo, em geral, podem ser representadas por modelos simples¹¹. O mecanismo simplificado para a reação catalítica de uma enzima (E), envolve apenas um único reagente, o substrato (S). Esta reação inicia-se com a formação rápida e reversível do complexo enzima-substrato (ES), que se decompõe lentamente, e de forma irreversível, na enzima livre (E) e no produto da reação (P), como se verifica pela equação 1.1³.



Cada reação elementar é caracterizada por uma constante de velocidade: k_1 (s^{-1}), e k_{-1} (s^{-1}) que corresponde às constantes de velocidade da reação, no sentido direto e inverso, respetivamente e o k_{cat} (s^{-1}) é a constante de velocidade catalítica³. Assume-se que $k_{-1} \gg k_{cat}$, de modo que a formação do complexo ES possa ser tratado como um processo de equilíbrio rápido. O segundo passo da reação é o passo limitante da velocidade de reação, definido por $v = k_{cat} \times [ES]$. A cinética enzimática pode ser descrita em termos da concentração inicial de substrato ($[S]_0$) e pela velocidade de reação inicial (v_0). A relação matemática entre estes dois parâmetros é descrita pela equação de Michaelis-Menten (equação 1.2), cujo perfil gráfico está representado na figura 1.2. O $v_{0,max}$ é a velocidade inicial máxima da reação e o K_M é a constante de Michaelis-Menten³ definida pela equação 1.3.

$$v_0 = \frac{v_{0,max} \times [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad \text{equação 1.2}$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad \text{equação 1.3}$$

Quando $k_{-1} \gg k_{cat}$ como assumido anteriormente, K_M pode ser expresso pela razão k_{-1}/k_1 , que é equivalente à constante de dissociação (K_d) para o complexo ES. Consequentemente, o valor de K_M é uma indicação da afinidade da enzima para o substrato, ou seja, um valor de K_M baixo significa que a enzima forma uma ligação forte com o substrato, enquanto que um valor de K_M elevado indica uma afinidade baixa da enzima para o substrato³.

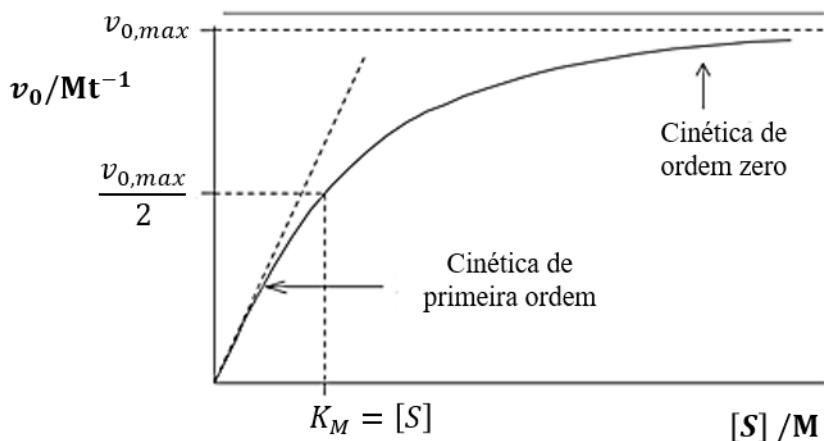


Figura 1.2: Velocidade da reação em função da concentração de substrato, curva de Michaelis-Menten - adaptado da referência (11).

Quando a concentração de substrato varia e a concentração de enzima é mantida constante, a velocidade de reação aumenta até uma determinada concentração de substrato que é suficiente para complexar todas as enzimas, de forma a que mais nenhum aumento na concentração de substrato levará à formação do complexo enzima-substrato, e por isso não haverá mais nenhum efeito na velocidade (zona de patamar, figura 1.2)¹¹. Para uma concentração de substrato baixa ($[S]_0 \ll K_M$), a velocidade da reação é proporcional à concentração ($[S]_0$). Nesta situação a velocidade de reação é de primeira ordem^{3,11} em relação à concentração do substrato (equação 1.4) e a gama de concentração que verificam esta condição definem os limites da curva de calibração, cujo declive representa a sensibilidade do biossensor. A uma concentração de substrato elevada ($[S]_0 \gg K_M$) a enzima está saturada pelo substrato e v_0 não depende mais da concentração de substrato inicial, $[S]_0$. Nestas circunstâncias a reação catalítica obedece a uma cinética de ordem zero ($v_0 = v_{0,max}$). Neste momento, v_0 alcança o seu valor máximo e é limitado apenas pelas condições experimentais (temperatura, pH, força iónica), a concentração de enzima total ($[E]_0$) e da constante catalítica (k_{cat}) (equação 1.5). Adicionalmente, pela equação de Michaelis-Menten também é possível observar que quando o valor de K_M correspondente à concentração inicial de substrato, a velocidade de reação é metade do valor máximo ($v_0 = v_{0,max}/2$ para $K_M = [S]_0$)³.

$$v_0 = \frac{v_{0,max} \times [S]_0}{K_M} \quad \text{equação 1.4}$$

$$v_{0,max} = k_{cat} \times [E]_0 \quad \text{equação 1.5}$$

Na construção de biossensores enzimáticos, é desejável obter valores máximos para o $v_{0,max}$ e mínimos para o K_M , de forma a que a reação seja rápida e com uma afinidade alta para o substrato/analito³. Ao adaptar a equação 1.2 para a determinação destes parâmetros, por técnicas eletroquímicas⁸, nomeadamente por voltametria cíclica³, obtêm-se a seguinte expressão:

$$i_{cat} = \frac{i_{max} \times [S]}{K_M^{app} + [S]} \quad \text{equação 1.6}$$

Onde i_{cat} é a corrente catalítica obtida em cada medição eletroquímica, i_{max} representa a corrente catalítica máxima que é observada em condições onde a enzima está saturada, $[S]$ é a concentração de substrato e o K_M^{app} representa a constante de Michelis-Menten aparente, uma vez que se refere ao sistema enzima/elétrodo, e não só da enzima⁸.

Inibição enzimática

Existem vários mecanismos pela qual a enzima pode ser inibida. A inibição da enzima pode ser reversível, se a atividade catalítica for restaurada na ausência do inibidor, ou irreversível, se a ligação com o inibidor resulta na perda permanente da atividade enzimática^{12,13}. Para os inibidores irreversíveis a interação entre a enzima e o inibidor (EI) resulta na formação de uma ligação covalente que ao ser decomposto origina a inativação da atividade catalítica^{9,12,14,15}. No caso da inibição reversível, existem duas formas principais do inibidor interagir com a enzima. A inibição da enzima pode ser competitiva ou não competitiva. Na figura 1.3 está representado o mecanismo de reação para as três situações abordadas.

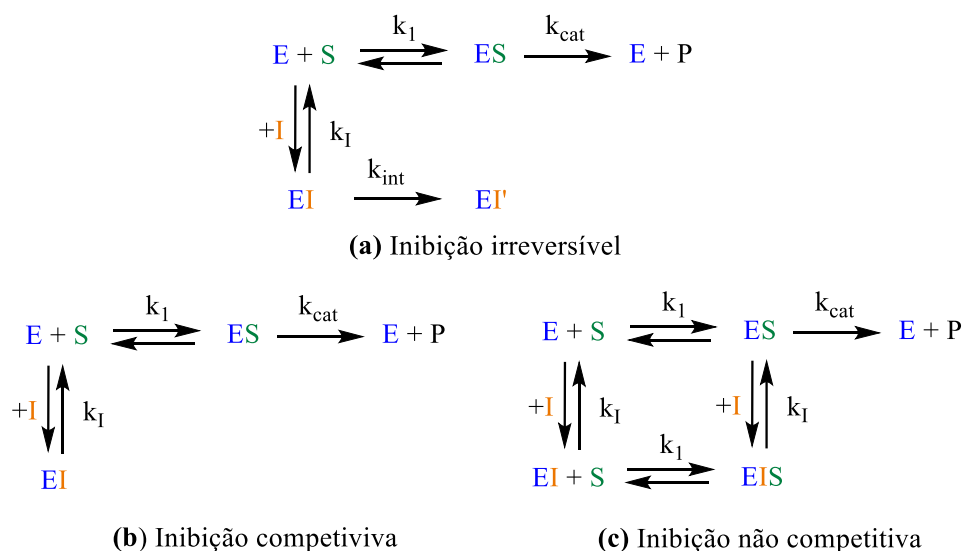


Figura 1.3: Mecanismo de reação entre a enzima e o respetivo substrato na presença de um inibidor da atividade catalítica. Inibição irreversível (a) e inibição reversível competitiva (b) ou não competitiva (c) – adaptado da referência (14)

Na inibição competitiva, o inibidor está estruturalmente relacionado com o substrato. Nesta situação o inibidor liga-se ao centro ativo e compete com o substrato^{9,12-14}. Consequentemente, a utilização de concentrações elevadas de substrato pode não permitir a deteção de concentrações baixas de inibidor e, por isso, a concentração do substrato deve ser escolhida considerando este fator¹³. Na inibição não competitiva, o inibidor pode estar ligado à enzima. O centro ativo é frequentemente deformado e a sua função é prejudicada. Nesta situação o substrato e o inibidor não competem entre eles^{9,13,14}. Desta forma, não há limitação em relação à concentração de substrato, uma vez que o grau de inibição não vai depender desta variável¹³. A alteração dos parâmetros cinéticos da enzima na presença do inibidor está sumariada na tabela 1.1.

Tabela 1.1: Parâmetros cinéticos que são afetados pela presença do inibidor ao comparar com resultados da atividade catalítica apenas na presença do substrato – adaptado da referência (12).

Tipo de inibidor	Influência no K_M	Influência no $v_{0,max}$	Local de ligação
Competitivo	Diminuição	Sem alteração	Competição entre o substrato e inibidor pelo centro ativo
Não Competitivo	Sem alteração	Diminuição	O inibidor não se liga ao centro ativo e, por isso não compete com o substrato

Métodos de imobilização de enzimas

Com o intuito de obter um sensor viável, o elemento de reconhecimento biológico deve ser imobilizado no transdutor de forma apropriada¹⁶, ou seja, em contacto próximo com o transdutor³, de modo a facilitar a interação (ex.: transferência eletrónica) entre os dois⁸. As enzimas imobilizadas devem manter a sua estrutura e função, para não perder a atividade catalítica e assim, assegurar a sensibilidade e seletividade do biossensor. Cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens e a escolha do método mais apropriado depende da natureza da enzima, do transdutor e da aplicação do biossensor¹⁷. Existem quatro estratégias principais, apresentadas na figura 1.4 para a imobilização da enzima, nomeadamente a adsorção, ligação covalente, encapsulamento ou *cross-linking*^{9,14,16,17}.

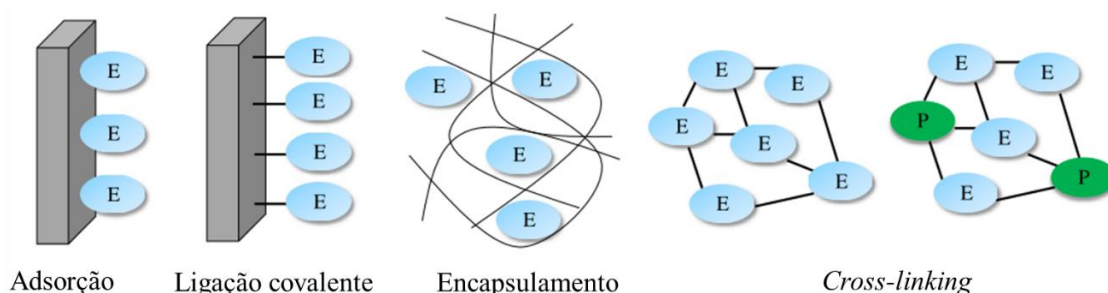


Figura 1.4: Estratégias para a imobilização de enzimas na superfície de um transdutor - adaptado da referência (3). E - enzima; P- proteína

A adsorção é o método mais simples e envolve uma preparação mínima. Neste método, não é necessário a utilização de reagentes¹⁶. O mecanismo de adsorção é baseado em ligações fracas como forças de van der Waals^{16,17} e eletrostáticas. Esta técnica não envolve qualquer funcionalização do suporte e geralmente é não destrutiva para a atividade enzimática. Contudo, existem algumas desvantagens, como a possível dessorção da enzima para o meio, e a adsorção não-específica de outras substâncias¹⁷. A ligação covalente de enzimas a um suporte sólido (material orgânico, polímero sintético ou natural)¹⁷ é efetuada através de grupos funcionais que não são essenciais para a atividade catalítica^{16,17}, como por exemplo os grupos NH_2 , CO_2H , OH , $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$, e SH ¹⁶. A ligação de enzimas ao suporte sólido é geralmente realizada pela ativação da superfície, seguido do acoplamento da enzima ao suporte ativado. A vantagem particular deste método é que a enzima não é libertada durante o uso¹⁷. No método de imobilização por encapsulamento, as enzimas podem ser imobilizadas numa matriz

tridimensional como um filme eletropolimerizado, um gel de sílica, ou uma pasta de carbono. Esta técnica de imobilização é fácil de realizar e não requer nenhuma modificação no elemento biológico, pelo que a atividade da enzima é preservada¹⁷. A imobilização de enzimas por *cross-linking* com glutaraldeído ou outro agente bio-funcional é outra abordagem para o desenvolvimento de biossensores. A enzima pode ser ligada sozinha ou na presença de outra proteína inerte funcionalizada, como a albumina de soro de bovino. Este método é atrativo devido à sua simplicidade e à ligação química forte que é alcançada entre as biomoléculas. A desvantagem principal é a possibilidade da perda de atividade enzimática devido à distorção da conformação da enzima e das alterações químicas do centro ativo durante o *cross-linking*¹⁷.

1.1.2. Transdutores eletroquímicos

Os transdutores eletroquímicos utilizados em biossensores enzimáticos dividem-se em potenciométricos, condutimétricos, impedimétricos e amperométricos dependendo da propriedade que está a ser medida, potencial, condutividade, impedância ou corrente, respetivamente¹⁸. O modo de transdução amperométrico é um dos mais indicados para enzimas redox devido à facilidade na transdução das reações de oxidação e redução em sinais elétricos. Além disso, são adequados para a produção em massa de biossensores³. Por estes motivos, foi a técnica eletroquímica escolhida para a transdução do sinal do biossensor desenvolvido neste trabalho e, por isso, a única que irá ser abordada nesta secção.

Os dispositivos amperométricos medem continuamente a corrente resultante da oxidação ou redução de uma espécie eletroativa numa reação^{4,18}. Normalmente, se a corrente é medida a um potencial constante é referido como amperometria. Se a corrente é medida durante variações controladas de potencial, é referido como voltametria¹⁸. Esta última técnica é muito versátil, sendo possível detetar múltiplos compostos numa única experiência eletroquímica, desde que o potencial a que ocorre a redução ou oxidação seja diferente². Um aspeto essencial na construção destes biossensores é a facilidade da transferência eletrónica entre a enzima e a superfície do transdutor⁶. Nos biossensores enzimáticos amperométricos existem duas formas de assegurar a interação entre o transdutor e a enzima. Por um lado, a troca de eletrões entre os dois componentes pode ser realizada pela utilização de mediadores naturais, como o oxigénio molecular e o peróxido de hidrogénio, ao que corresponde os biossensores de primeira geração (figura 1.5 (a)), ou por mediadores sintéticos, no caso dos biossensores de segunda geração (figura 1.5 (b)). Por outro lado, a troca de eletrões entre o transdutor e a enzima pode ser obtida de uma forma direta, sem a utilização de qualquer mediador (figura 1.5 (c)); os biossensores com estas características são considerados de terceira geração⁵.

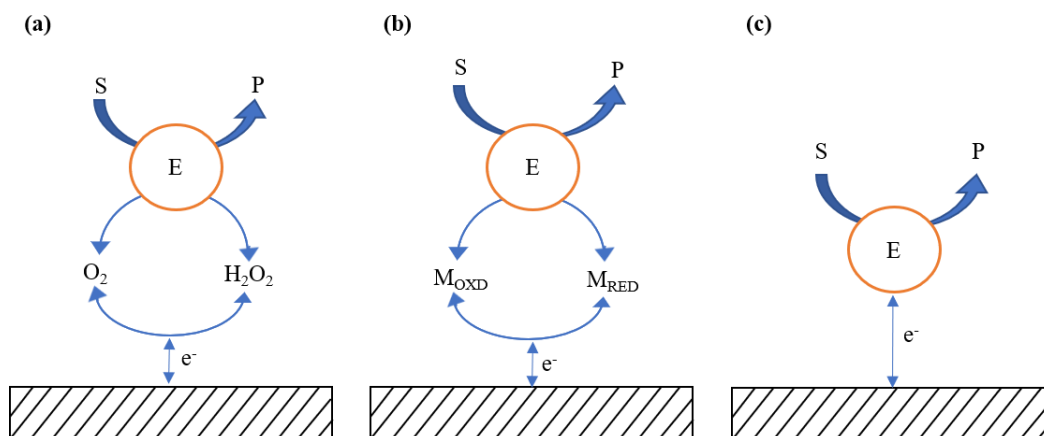


Figura 1.5: Resposta de diferentes gerações de biossensores amperométricos enzimáticos. **(a)** corresponde à primeira geração de biossensores onde o co-substrato é utilizado como indicador redox, **(b)** corresponde à segunda geração de biossensores onde um mediador redox artificial é usado para fazer a troca de elétrons e **(c)** que corresponde à terceira geração de biossensores onde existe transferência eletrônica direta entre a enzima e o eletrodo.

Os biossensores com transferência eletrônica direta entre o centro redox da enzima e o eletrodo são caracterizados por uma seletividade e sensibilidade maior, visto que podem operar numa janela de potenciais próxima ao potencial redox da enzima sem recurso a reagentes adicionais, proporcionando uma produção simples e com poucos reagentes⁶. Além disso, como não requerem mediadores (sintéticos ou naturais) para a transferência eletrônica, são menos suscetíveis à interferência deste reagente/co-substrato^{3,6}. Porém, a transferência eletrônica direta entre as enzimas e os transdutores é difícil de alcançar, devido às cadeias polipeptídicas que protegem os centros catalíticos³ e por isso, nem todas as enzimas apresentam transferência eletrônica direta quando imobilizadas na superfície do transdutor, sendo as enzimas mais utilizadas o citocromo c, oxidases de multicobre e diversas peroxidases⁶.

Materiais de carbono

O carbono é um material frequentemente utilizado em eletrodos¹⁹, uma vez que apresenta diversas vantagens, tais como baixo custo, janela larga de potenciais e relativamente inerte do ponto de vista eletroquímico. Os materiais de carbono clássicos utilizados como eletrodos são o carbono vítreo (GCE), *carbon Black* ou várias formas de grafite²⁰, como a grafite pirolítica¹⁹ (PGE) e a grafite pirolítica altamente ordenada (HOPG)²⁰. Estes materiais de grafite são constituídos por folhas de grafeno em camadas, cujos átomos de carbono apresentam uma hibridação sp^2 , onde cada folha de grafeno está ligada por interações fracas de Van der Waals. De acordo com esta estrutura, a qual confere propriedades anisotrópicas ao material, a superfície exposta da grafite pode apresentar duas configurações diferentes: referente ao plano basal (plano paralelo à camada de grafite) ou referente ao plano *edge* (plano perpendicular à camada de grafite)²¹.

As minas comerciais, são outro material constituído por grafite e argila, que têm vindo a ser testadas como eletrodos na construção de biossensores. Mesmo com a adição da argila, que confere uma composição heterogênea, é possível obter estabilidade e reprodutibilidade analítica, usando sondas redox como o $[Fe(CN)_6]^{-3/4}$ e $[Ru(NH_3)_6]^{+2/+3}$ ²². Este material compósito pode oferecer diversas vantagens em comparação com os outros materiais clássicos de carbono, uma vez que são materiais económicos, com propriedades condutoras, disponíveis comercialmente, apresentando diâmetros e

dureza diferentes. Além disso podem ser cortados em cada utilização, permitindo obter uma nova superfície, com procedimentos simples e rápidos de polimento e limpeza²². A adição da argila tem uma influência importante nas propriedades químicas (troca iônica) e estruturais (morfologia da superfície) das minas de grafite. Dependendo da marca, podem gerar diferentes respostas, mesmo em minas com a mesma dureza²³. A dureza das minas está relacionada com a percentagem de grafite e argila utilizada na sua produção. As minas com a letra H apresentam uma maior quantidade de argila (razão baixa grafite/argila) e por isso são mais duras, enquanto que as minas com a letra B apresentam uma quantidade maior de grafite (razão elevada grafite/argila), sendo mais macias ao escrever^{22,23}. As minas que apresentam a designação HB são constituídas por grafite e argila em igual proporção²³.

As propriedades elétricas dos elétrodos de minas de grafite, como a condutividade, dependem especialmente do conteúdo de carbonáceos. Portanto, seria de esperar que as minas mais macias (minas B) fossem as ideais para a utilização em elétrodos. Contudo, nem sempre se verifica esta condição. Na verdade, as minas/lápis mais macias são vantajosas para desenhar elétrodos (miniaturizados) em superfícies planas celulósicas. Mas, para outras aplicações, a variação da dureza (conteúdo de argila), bem como a marca particular do lápis, têm uma grande influência no desempenho do elétrodo²². Considerando que a cinética da transferência eletrônica é dependente da estrutura e preparação da superfície¹⁹, durante a construção do biossensor podem ser realizados diferentes pré-tratamentos nos elétrodos, como o polimento mecânico, químico, eletroquímico (potenciostático/ potenciodinâmico) ou uma combinação de todos. Não existe um protocolo correto, uma vez que o procedimento escolhido influencia o desempenho final do biossensor. Se o objetivo do pré-tratamento for melhorar a adsorção da superfície, através da criação de grupos funcionais, o pré-tratamento eletroquímico deve ser adotado²².

1.2. Cianeto

1.2.1. Ocorrência e toxicidade

As espécies cianogénicas estão presentes em alimentos comuns no dia a dia, como em maçãs, mangas²⁴, damascos, pêsegos²⁵, feijões e amêndoas²⁶. Foram descobertas pelo menos mil espécies de plantas e microrganismos, que produzem um ou mais compostos cianogénicos. Provavelmente, a planta mais perigosa é a mandioca, uma fonte importante de alimento na África e em outras regiões equatoriais, que contém dois compostos cianogénicos, a linamarina e a lotaustralina (figura 1.6)²⁷.

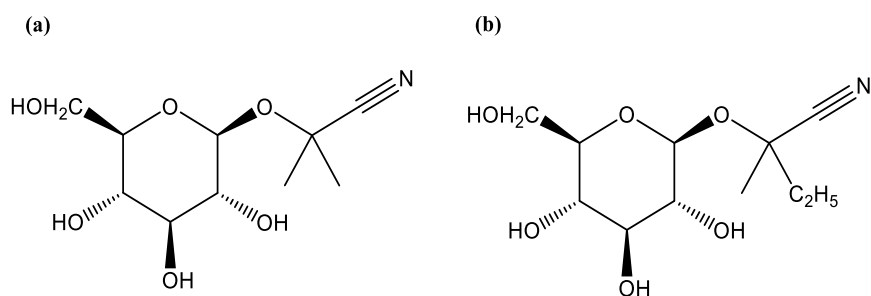


Figura 1.6: Estrutura química dos compostos cianogénicos presentes na mandioca: Linamarina (a) e lotaustralina (b).

A aplicação industrial do cianeto teve início em 1885, quando foi descoberto o processo de Mc Arthur-Forest ou cianetação do ouro, a qual permite a extração deste minério a partir da formação de um complexo solúvel em água, que é posteriormente recuperado. Apesar do seu uso mais comum nesta indústria ser dedicado à extração do ouro, também é usado para a extração da prata, do cobre e do zinco. Além desta aplicação, o cianeto é utilizado na produção de papel, têxteis, plásticos²⁶⁻²⁸ e nitrilos²⁸, na metalurgia²⁵⁻²⁹, na limpeza de metais²⁶, na fumigação^{29,30}, na cosmética, farmacêutica, controlo de pestes e na indústria alimentar²⁷, como agentes antiaglomerantes²⁵. Na aquacultura, o cianeto (CN⁻) é utilizado de forma ilícita para atordoar peixes exóticos^{27,30}, desde os anos 60³⁰. Esta prática envolve o seu uso em doses sub-letais que atordoam os peixes, prejudicando irreversivelmente os recifes, nomeadamente as algas e espécies de peixes mais pequenas³¹.

Em mamíferos, peixes e alguns invertebrados, o cianeto, restringe a funcionalidade da oxidase do citocromo *c*, responsável pelo transporte do oxigénio no sangue^{24,27,31}. O metabolismo anaeróbico induzido pelo cianeto leva à acumulação de ácido láctico no sangue²⁶ que combinado com o baixo teor de oxigénio, provoca distúrbios no sistema nervoso central, provocando paragem respiratória e morte^{28,26}. A concentração deste agente tóxico, no sangue, é considerada letal a partir de 37 mmol/L²⁷. Devido à sua vasta aplicação e ao perigo que representa para a saúde humana o conselho da União Europeia, na diretiva 98/83/EC, definiu um valor máximo para a concentração do contaminante de 1,92 µM em águas de consumo³² e 2,69 µM em águas minerais na diretiva 2003/40/EC³³.

1.2.2. Métodos para a deteção

Existem diversos métodos padrão para a determinação de cianeto em meio aquoso. O método mais antigo corresponde à titulação deste ião com uma solução de nitrato de prata (equação 1.7), que origina um complexo metálico solúvel, [Ag(CN)₂]⁻. Quando os iões prata ficam em excesso na solução, podem ser detetados através do indicador p-dimetilaminobenzalrodamina^{34,35} ou por métodos potenciométricos³⁶.



Este procedimento é adequado apenas para concentrações de cianeto elevadas e sem a presença de outros complexos metálicos ou outros interferentes³⁴. Os métodos colorimétricos também são aplicados para a determinação do anião e, contrariamente às titulações, são adequados para concentrações baixas do contaminante (inferior a 1 mg/mL). Com a adição de cloroamina-T, o cianeto é oxidado a ClCN (pH < 8), o qual pode ser detetado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 578 nm³⁵.

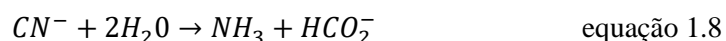
A utilização de elétrodos seletivos de cianeto, é também um método comum para quantificação do ião. Estes elétrodos consistem numa membrana cristalina que utiliza a interação do cianeto com a prata ou o ouro²⁷, havendo uma variedade de elétrodos comercializados³⁷⁻³⁹. A desvantagem desta aplicação é que os elétrodos podem responder também para um número de interferentes como enxofre, iodo, bromo, cádmio, prata, cobre, zinco, níquel e mercúrio³⁴ e nem sempre cobrem a concentração máxima do contaminante imposta pela EU^{37,38}. Os métodos cromatográficos, como a cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia iónica também são empregues para a deteção de cianeto. Estes métodos estão acoplados a detetores de captura eletrónica, UV-vis, fluorescentes,

condutimétricos ou amperométricos. A espectroscopia de absorção atômica também é utilizada, mas é um método menos comum³⁴.

Nos métodos certificados para a determinação de cianeto, é necessário um pré-tratamento para remover interferentes³⁵. Os pré-tratamentos para a extração de cianeto de matrizes aquosas usualmente envolvem a acidificação da amostra seguida do aquecimento e refluxo (destilação) para que se forme o gás cianeto de hidrogénio (HCN), o qual é depois retido em meio alcalino (NaOH) para formar iões de cianeto livres (CN⁻)³⁴. Estas técnicas são operacionalmente complexas, demoradas e frequentemente requerem pré-concentração da amostra ou a utilização de solventes orgânicos³⁰.

1.2.3. Outras abordagens: biossensores

Outra abordagem para a deteção e quantificação de cianeto são os biossensores, que podem quantificar o analito através da degradação do composto tóxico, como é o caso das enzimas cianidase e rodenase⁴⁰, ou pela inibição da resposta do elemento de reconhecimento biológico. Um sensor amperométrico, que combina as enzimas cianidase e desidrogenase do formato, foi desenvolvido para a deteção do cianeto com análise por injeção de fluxo (FIA). No entanto, não é considerado um biossensor, uma vez que o transdutor não está em contacto direto com a enzima. O cianeto é hidrolisado enzimaticamente a amónio e formato pela cianidase (equação 1.8). De seguida, o formato é oxidado a dióxido de carbono pela FDH na presença de nicotinamida adenina dinucleotido (NAD⁺) (equação 1.9). O NADH é detetado amperometricamente com um eléctrodo de trabalho de grafite e ao aplicar um potencial de 0,8 V vs. Ag/AgCl. Cada enzima está imobilizada em diferentes secções de coluna do sistema FIA. Primeiro a solução passa pela zona onde está imobilizada a cianidase e depois pela desidrogenase do formato⁴¹.



A utilização de microrganismos como elemento de reconhecimento biológico em biossensores, também é um método para a deteção e quantificação de cianeto. Considerando que o cianeto inibe a respiração celular, pela imobilização de microrganismos em eléctrodos de oxigénio, é possível verificar a diminuição do consumo de oxigénio por parte dos microrganismos, que se irá refletir na diminuição da corrente⁴²⁻⁴⁴. Além disso, as enzimas cuja atividade catalítica é inibida na presença do cianeto, também são estudadas para a quantificação do composto tóxico. A oxidase do citocromo *c*⁴⁵, a tirosinase⁴⁶, a polifenol oxidase (PPO)⁴⁷ e a peroxidase hémica (HRP, *horseradish peroxidase*)⁴⁸⁻⁵³ são as enzimas utilizadas em biossensores enzimáticos de inibição amperométricos para a determinação de cianeto (tabela 1.2). Até à data, não foi descrito nenhum biossensor de inibição para a deteção do cianeto utilizando a redutase do nitrito do citocromo *c* e minas de grafite como material transdutor.

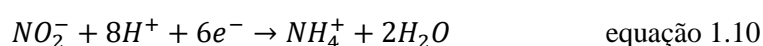
Tabela 1.2: Biossensores enzimáticos amperométricos para a detecção do cianeto.

Enzima	Preparação do biossensor	IL / μM	LOD / μM	ref
Oxidase do citocromo	Pasta de carbono modificada com asolectina + citocromo c + oxidase do citocromo	1-14	ND	45
Tirosinase	Tirosinase + membrana pré ativada de poliamida / eléctrodo de grafite	0,2- 40*	ND	46
PPO	PPO + argila aniónica [Zn-Al-Cl] + membrana de glutaraldeído / GCE	0,002-0,05*	0,0001*	47
HRP	HRP+[Zn-Cr-ABTS] LDHs/ GCE com revestimento de glutaraldeído	0,005 - 0,04	ND	48
HRP	HRP + quitosano / matriz de nanotubos de hidroxiapatita / GCE	0,08-3,07*	0,02*	49
HRP	HRP + quitosano e acrilamida / GCE (hidroquinona como mediador em solução)	1,64 - 13,13	0,43	50
HRP	HRP / PGE	$\approx 10 - 1000$	ND	51
HRP	HRP / eléctrodo de feltro de carbono	0,05 - 1	0,04	52
HRP	HRP + nanopartículas de ouro + BSA + glutaraldeído / eléctrodo de grafite suspensa num sonogel de MTMOS	0,1 - 58,6	0,03	53

*unidades convertidas

1.3. Redutase do nitrito

A redutase do nitrito do citocromo *c* (ccNiR) foi isolada pela primeira vez em 1981 utilizando a bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, ao crescer em meio anaeróbio e na presença de nitrito. Esta enzima catalisa a redução de 6 eletrões do nitrito (NO_2^-) a amónio (NH_4^+)⁵⁴⁻⁵⁷ (equação 1.10). Os estudos realizado sobre o mecanismo de reação desta enzima com o seu substrato sugerem que o nitrito é reduzido sem a libertação de algum intermediário, como o óxido nítrico (NO) e a hidroxilamina (NH_2OH)⁵⁶.



Esta enzima pode ser isolada como um complexo heterooligomérico composto por duas subunidades, a NrfA e a NrfH, (61kDa e 19kDa) que contêm hemo do tipo *c*⁵⁴. A estrutura da NrfA,

subunidade catalítica, da *D. desulfuricans* (figura 1.7) segue a típica estrutura dimérica, caracterizada por três hélices agrupadas na interface do dímero⁵⁷ (figura 1.7, (a)) e cada monômero apresenta 5 hemos (figura 1.7, (b)), sendo que a reação catalítica ocorre no hemo 1. Os hemos 2 a 5 têm o motivo de ligação característico do citocromo do tipo *c* (Bis-His) e pensa-se que constituam o armazenamento e zonas de transferência para o movimento de elétrons até ao hemo catalítico. Este hemo é de spin-alto e penta-coordenado com a lisina como ligando axial proximal ao ião ferro, substituindo o resíduo convencional de histidina, e com a posição distal do hemo férrico livre para acomodar o substrato^{56,57}.

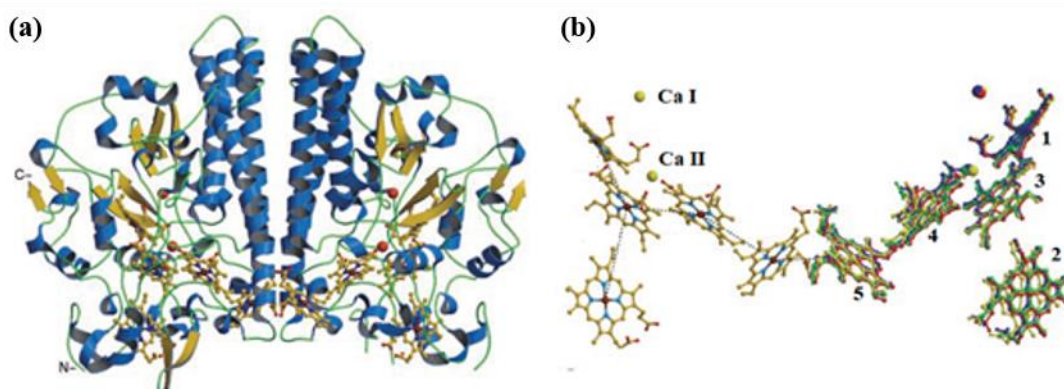


Figura 1.7: Estrutura da subunidade catalítica da redutase do nitrito do citocromo *c* obtida a partir da bactéria *D. desulfuricans*: estrutura do dímero (a), arranjo dos grupos hémicos e localização dos catiões cálcio (b) - adaptada da referência (57).

O centro catalítico da NrfA pode ser acedido por dois canais que levam até à superfície da proteína. Estes canais estão destinados para o substrato e para o produto, considerando que têm uma carga eletrostática total oposta aos aniões NO_2^- (substrato) e aos catiões NH_4^+ (produto)^{56,57}. Esta característica contribui para a elevada atividade catalítica da ccNiR⁵⁶. A subunidade não catalítica, NrfH (19kDa), compreende 4 grupos hémicos do tipo *c* e tem um prepósito duplo, une as subunidades catalíticas à membrana periplasmática e serve como uma oxidase da quinol, transferindo elétrons da quinona para as subunidades catalíticas. As subunidades da NrfH interagem com o dímero da NrfA de uma forma assimétrica, com apenas um dos monómeros catalíticos a receber os elétrons diretamente da NrfH⁵⁶.

1.3.1. Biossensores para a deteção nitrito

As enzimas nitrito redutases do citocromo *c* são umas das enzimas capazes de quantificar o nitrito. O ião está presente em águas, plantas, solos e em vegetais em menor quantidade. A níveis elevados, este composto representa um impacto negativo para a saúde humana, uma vez que oxida a hemoglobina e impede a ligação do oxigénio⁵⁸. Deste modo, há também uma necessidade de regulamentar a concentração de nitritos, para tal a União Europeia definiu que esse valor não poderia ser superior a 2,2 μM em água de consumo⁵⁹.

Os biossensores amperométricos para nitrito baseiam-se na enzima redutase do nitrito quer usando mediadores redox ou através de transferência eletrónica direta entre a proteína e a superfície do transdutor (figura 1.8). As ccNiRs são capazes de aceitar elétrons de vários mediadores, sendo os dadores de elétrons com potenciais redox negativos, como os corantes de viologénio, frequentemente os

escolhidos⁵⁸. Contudo, a utilização de mediadores afeta a estabilidade e a reprodutibilidade dos biossensores, devido à perda do mediador solúvel⁶ e a possibilidade do mediador poder reagir com outras espécies em solução e não somente com a enzima³. Considerando que a partir da ccNiR da bactéria *D. desulfuricans* ATCC 27774 é possível obter uma transferência eletrônica direta entre a enzima e o transdutor⁵⁸, os biossensores mediados deixaram de ter interesse. Note-se que é possível observar a corrente catalítica por transferência eletrônica direta tanto com a enzima encapsulada em poliacrilamida⁶⁰ ou em sílica porosa⁶¹, como apenas pela adsorção da enzima na superfície de um eletrodo de grafite pirolítica (PGE)^{55,62}.

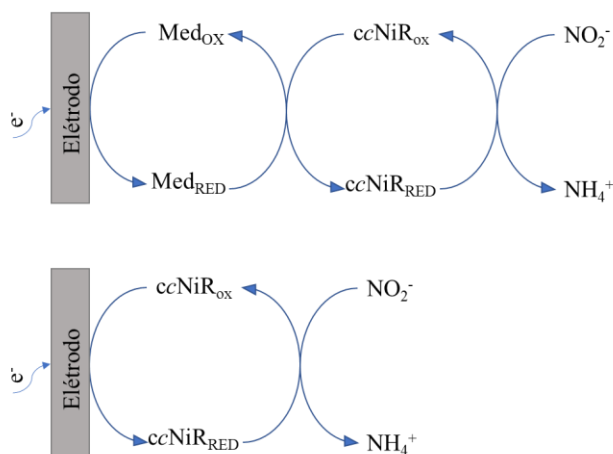


Figura 1.8: Transferência eletrônica para os biossensores amperométricos enzimáticos para a detecção de nitrito: utilização de mediador e transferência eletrônica direta.

Relativamente à aplicação de minas de grafite no desenvolvimento de biossensores de nitrito, não foi encontrado nenhum que utilize a redutase do nitrito como elemento de reconhecimento biológico. Para esta aplicação verificou-se a existência de um biossensor, constituído por uma mina H (2,0 mm de diâmetro), como transdutor, e com a enzima hemoglobina imobilizada na sua superfície. O eletrodo é polido com várias lixas, sem pré-tratamento eletroquímico e a presença de nitrito é detetada por voltametria de pulso diferencial (DPV)⁶³, entre 10 μ M a 220 μ M.

1.4. Objetivos e organização da dissertação

Neste trabalho propôs-se desenvolver um biossensor enzimático de inibição para cianetos de baixo custo que possa ser utilizado no local de amostragem. Para tal, utilizou-se como material de transdução minas de grafite comerciais. Considerando que o cianeto é um dos inibidores da enzima redutase do nitrito⁶⁴, utilizou-se esta biomolécula como elemento de reconhecimento no biossensor, que até à data ainda não tinha sido empregue. Assim, neste estudo propôs-se as seguintes metas:

- a) Caracterização de quatro minas grafite comerciais: HB da BIC e 3B, HB e 3H da KOH-I-NOOR;
- b) Estudo da resposta da enzima para o nitrito e cianeto;
- c) Adaptação de um sistema bi-enzimático para a remoção do oxigénio dissolvido na célula eletroquímica;
- d) Substituição do eletrodo de referência convencional por um eletrodo de minas de grafite.

Nesta dissertação será abordado os procedimentos e métodos experimentais, no capítulo 2, assim como os resultados obtidos e respetiva discussão no capítulo 3. No final, são apresentadas as conclusões do trabalho e perspetivas futuras no capítulo 4.

Capítulo 2:

Procedimento e métodos experimentais

2. Procedimento e métodos experimentais

Nesta investigação, foi estudado a resposta do biossensor para a deteção de nitrito e cianeto, no grupo GB2, na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, foi realizada a caracterização das minas de grafite, no laboratório de eletroquímica interfacial, na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. As técnicas abordadas são a voltametria cíclica (CV) e de onda quadrada (SWV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), microscopia de força atômica (AFM), microscopia de varrimento eletrónico (SEM) acoplada a espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) e difração de raios X (XRD).

2.1. Materiais e reagentes

Neste trabalho foram utilizados como material para eléctrodos as minas HB, 3B e 3H da marca KOH-I-NOOR e as minas HB da marca BIC, todas com um diâmetro de 2 mm. As mangas termo-retráteis VELLEMAN utilizadas para isolar as minas e as folhas de lixa de água Dexter com um grão de 280, 500 e 1000 foram adquiridas ao Leroy-Merlin. Para a caracterização das minas de grafite utilizou-se hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) e hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) obtidos pela Merck (grau de pureza *p.a.*). O tris(hidroximetil)aminometano ($NH_2C(CH_2OH)_3$; 99,8%) foi adquirido à Acros Organics. O cloreto de potássio (KCl; 99,5%) foi obtido na Riedel-deHaen e o ácido clorídrico (HCl; ~37 %) obtido pela Fisher Chemical. No desenvolvimento do biossensor para a deteção de nitrito e cianeto, a redutase do nitrito da bactéria *D. desulfuricans* ATCC 27774 foi extraída e purificada no grupo GB2 e armazenada em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,6). O nitrito de sódio ($NaNO_2$; ≥99,0%) e o cloreto de potássio (KCl; 99,9%) foram obtidos a partir da Analar Normapur. O tris(hidroximetil)aminometano ($NH_2C(CH_2OH)_3$; ≥ 99,9%), a glucose oxidase (GOx; *Aspergillus niger*), a catalase (fígado de bovino) e a D-(+)-glucose ($C_6H_{12}O_6$; ≥99,5%) foram adquiridas à Sigma. O cianeto de potássio (KCN) com grau *p.a.* foi obtido na Merck. O ácido clorídrico (HCl; ~37%) e o hidróxido de sódio (NaOH; ≥ 98%) foram obtidos na Sigma-Aldrich. A alumina para micropolimento (0,3 μm) foi adquirida à Buehler. Todas as soluções foram preparadas com água desionizada ($\rho > 18 M\Omega \cdot cm$) obtida a partir de um sistema Milli-Q da Millipore. As soluções tampão utilizadas na caracterização e no desenvolvimento do biossensor estão apresentadas na tabela 2.1. As soluções e nitrito de sódio, com concentração entre 0,1 mM a 100 mM foram preparadas com 2 mM de hidróxido de sódio e as soluções de cianeto de potássio com uma concentração de 1 mM e 10 mM foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,1 M com 0,1 M de KCl na presença de 5 μM, 10 μM, 20 μM ou 40 μM de nitrito. As soluções das enzimas GOx e catalase foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,1 M e KCl 0,1 M (pH = 7,6), com a concentração de 19 mg/mL e 25 mg/mL respetivamente.

Tabela 2.1: Composição das soluções tampão utilizadas para a caracterização das minas de grafite e no estudo da resposta do biossensor para nitrito e cianeto.

Solução	Composição
Solução tampão Tris-HCl, KCl e $\text{Fe}[\text{CN}]_6^{-3/4}$	0,1 M Tris; 0,1 M KCl; 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; pH = 7,6 ajustado com HCl 1 mM
Solução tampão Tris-HCl e KCl	0,1 M Tris; 0,1 M KCl; pH = 7,6 ajustado com HCl 5mM

2.2. Técnicas eletroquímicas

2.2.1. Célula e eletrodos

Nos ensaios eletroquímicos realizados foram utilizadas células eletroquímicas (figura 2.1) de dois (a) e de um compartimento (b), ambas contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho (1), eletrodo de referência (2) e um contra eletrodo (3), utilizadas para a caracterização dos eletrodos comerciais e para o estudo do desempenho do biossensor, respectivamente. Como eletrodo de trabalho foram utilizados eletrodos de grafite pirolítica (PGE) e eletrodos de minas de grafite comerciais: HBBICPE (mina HB da BIC), HBKOHPE (mina HB KOH-I-NOOR), 3HKOHPE (mina 3H KOH-I-NOOR) e 3BKOHPE (mina 3B KOH-I-NOOR). Para eletrodo de referência utilizou-se um eletrodo saturado de calomelanos (SCE), um eletrodo de Ag/AgCl, assim como as minas de grafite comercial. O eletrodo de platina foi utilizado como contra eletrodo, em todos os ensaios.

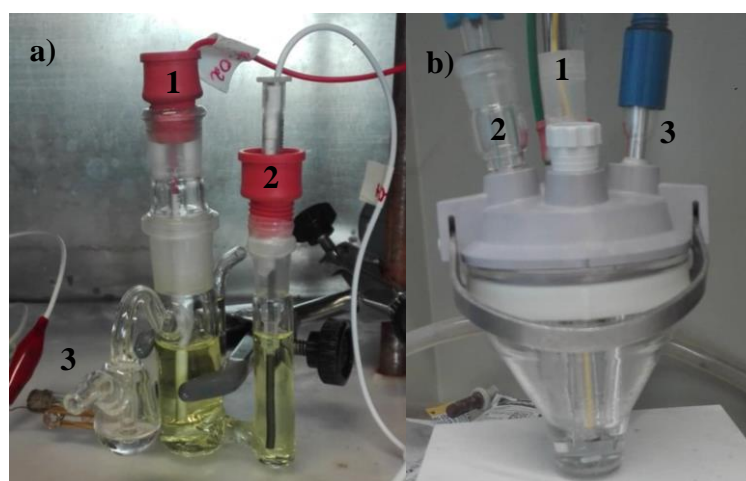


Figura 2.1: Células eletroquímicas utilizadas nos ensaios com dois (a) e um compartimento (b), utilizadas para a caracterização dos eletrodos comerciais e para o estudo do desempenho do biossensor, respectivamente. Os dois tipos de célula contêm três eletrodos: eletrodo de trabalho (1), eletrodo de referência (2) e um contra eletrodo (3).

Preparação e limpeza dos eléctrodos de trabalho

Os eléctrodos de minas de grafite foram construídos no laboratório, utilizando os materiais apresentados na imagem (a) da figura 2.2. Nos eléctrodos de trabalho, como exemplificado em (b) na figura 2.2, de forma a controlar a área do eléctrodo exposta, a mina (3) é coberta por duas mangas termo-retráteis (4), ficando apenas o topo da mina exposto ($A = 0,0314 \text{ cm}^2$; $d = 2 \text{ mm}$). O contacto elétrico é realizado com um fio de cobre (1) enrolado à volta da mina. No final, a mina é colocada dentro de uma seringa (2). No caso dos eléctrodos de grafite utilizados para substituir os eléctrodos de referência convencionais, apenas o contacto elétrico é coberto com as mangas termo-retráteis, como ilustrado na figura 2.2 (c).

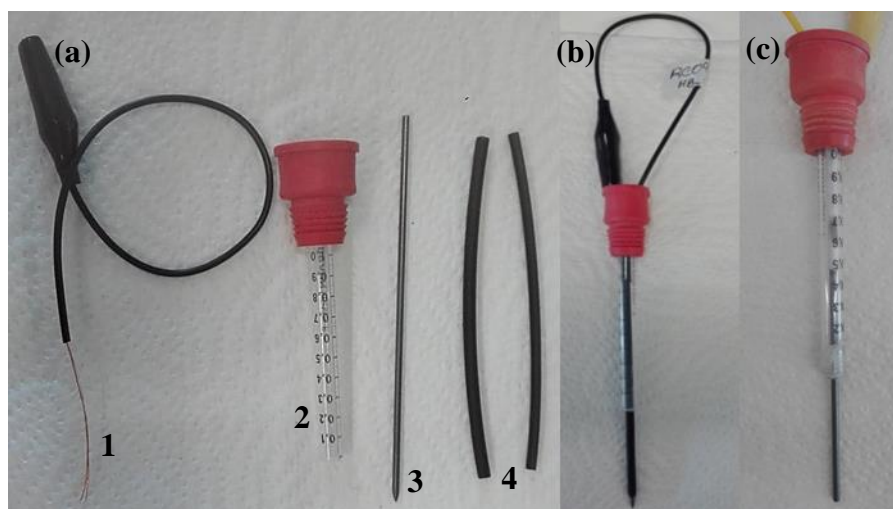


Figura 2.2: Materiais utilizados para a construção dos eléctrodos de grafite (a): fio de cobre para o contacto elétrico (1), seringa para o suporte da mina de grafite (2), mina de grafite comercial (3) e duas mangas termo retrateis (4). Exemplo de um eléctrodo de trabalho (b) e de um eléctrodo de referência de minas de grafite (c).

Antes de ser utilizado, cada eléctrodo de minas de grafite foi polido mecanicamente, através de três lixas com diferentes tipo de grão (280, 500 e 1000), começando da mais rugosa (280) para a menos rugosa (1000), durante um minuto, na presença de água desionizada. O polimento é realizado ao fazer movimento em forma de um oito, como exemplificado na figura 2.3. Após o polimento com cada uma das lixas, os eléctrodos foram lavados abundantemente com água desionizada e sonicados, num banho de ultrassom Branson 1510 ou Elma Transsonic 460/H, durante 5 minutos. Após este passo são novamente lavados com água desionizada abundantemente. A modificação da superfície do eléctrodo com a enzima redutase do nitrito do citocromo *c* é efetuada por adsorção de uma solução de enzima. Na superfície dos eléctrodos é colocada 3 μL de uma solução de enzima com concentração de 0,75 mg/mL (tampão fosfato 0,1 M, pH=7,6), ou seja 2,25 μg de enzima na superfície do eléctrodo. Os eléctrodos são deixados a secar a uma temperatura ambiente (entre 20-22 $^{\circ}\text{C}$) e utilizados no próprio dia. Os eléctrodos de trabalho de grafite pirolítica (PGE) plano *edge* apresentavam uma área geométrica de 0,097 cm^2 . Antes de serem utilizados foram polidos com alumina 0,3 μm (como reportado na literatura^{55,64-67}), durante 2 minutos, lavados com água e etanol e sonicados durante 5 minutos. A imobilização da enzima foi realizada da mesma forma do que nos eléctrodos de minas. Porém, devido à área maior deste eléctrodo, foi colocado 5 μL da solução de enzima a 0,75 mg/mL, que corresponde a 3,75 μg de enzima.

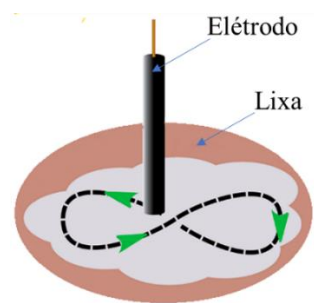


Figura 2.3: Movimento em oito para o polimento dos eletrodos de grafite comercial e de grafite pirolítica – adaptado da referência (68).

2.2.2. Voltametria cíclica e de onda quadrada

Considerações teóricas

A voltametria cíclica é um método de varrimento de potencial, muito usado para estudar os processos de oxidação e redução que ocorrem na superfície do eletrodo. Este método consiste na aplicação ao eletrodo de trabalho de um potencial que varia continuamente com o tempo e conduz à ocorrência de reações de oxidação e redução das espécies eletroativas (reações faradaicas)¹⁹. Na voltametria cíclica, o potencial aplicado no eletrodo de trabalho é controlado pelo eletrodo de referência e varia linearmente com o tempo (figura 2.4, (a)). O potencial parte de um valor inicial (E_i) e varia até ao valor final imposto (E_f), de seguida o sentido do varrimento é revertido e o potencial volta para o valor inicial (E_i)². Durante o ensaio o potencial é varrido a uma determinada velocidade, que corresponde à velocidade de varrimento (v)⁶⁸. A corrente em função do potencial, origina o voltamograma cíclico (figura 2.5, (b)) que dá informação sobre a natureza da solução e dos eletrodos e das reações que ocorrem na interface⁶⁹, nomeadamente as reações de oxidação e redução¹⁹. A interface eletrodo-solução tem uma gama de potenciais onde não ocorre reações de transferência de carga. Contudo, a estrutura da interface eletrodo-solução pode ser alterada com a alteração do potencial ou composição da solução, originando os processos não faradaicos⁶⁹.

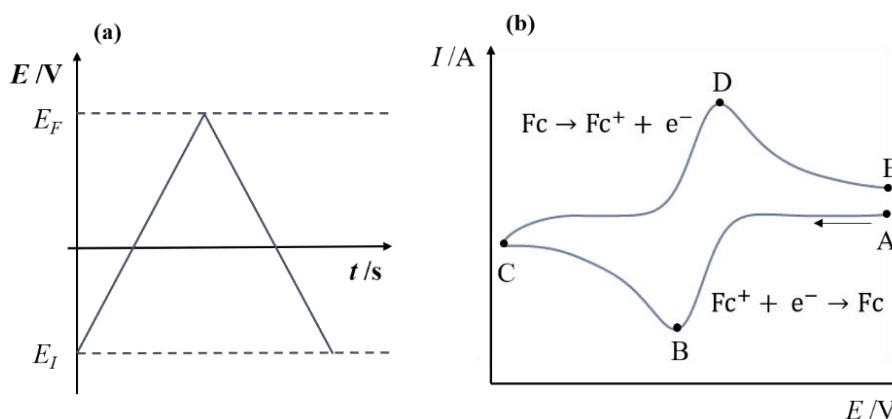


Figura 2.4: Variação do potencial em função do tempo (a) e voltamograma cíclico da redução e oxidação de uma espécie eletroativa, Fc^+/Fc (b) - adaptado da referência (68).

Num sistema reversível, como representado na figura 2.4, ocorre tanto a redução como a oxidação das espécies eletroativas. À medida que o potencial é varrido para potenciais mais negativos de A \rightarrow C, a espécie Fc^+ é reduzida. Do ponto A ao ponto B há a difusão da espécie Fc^+ para a superfície do eletrodo, onde o ponto B corresponde ao potencial do pico catódico (E_p^c). A partir do ponto B ao C há uma concentração mais elevada da espécie Fc e por isso a velocidade de difusão da espécie Fc^+ para a superfície do eletrodo é menor, consequentemente, há um decréscimo da corrente. Quando o potencial chega ao ponto C é revertido e dá lugar ao processo de oxidação da espécie Fc , onde o ponto D corresponde ao potencial do pico anódico (E_p^a)⁶⁸. A corrente obtida no pico catódico, designa-se por i_p^c e a corrente obtida no pico anódico, designa-se por i_p^a ; num sistema reversível, a razão entre as duas correntes, em módulo, é igual a 1 ($i_p^a/i_p^c = 1$). A separação dos picos deve-se à difusão do analito do eletrodo para a solução e da solução para o eletrodo. Se o processo redox é reversível, a diferença entre o potencial de pico anódico e catódico, ao qual se chama separação dos picos (ΔE_p), deveria ser 57 mV por eletrão, a 25°C. Quando existe uma barreira de energia elevada para a transferência eletrónica, as reações de transferência eletrónica são mais lentas e dão origem a valores elevados de ΔE_p ⁶⁸.

A voltametria de onda quadrada é uma técnica eletroquímica de pulso, rápida e sensível. Esta técnica baseia-se na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial⁷⁰. A forma de onda pode ser vista como uma onda quadrada sobreposta numa escada^{19,69}, onde um ciclo completo de onda quadrada corresponde à duração de um degrau¹⁹ (figura 2.3). O Varrimento começa a um potencial inicial imposto que pode ser aplicado por um tempo determinado⁶⁹ e os parâmetros da forma da onda a serem considerados são o ΔE que corresponde ao incremento do potencial na onda em forma de escada, o período do ciclo τ , a largura do pulso t_p , que está relacionada com a frequência, $f = 1/2t_p$, e a velocidade de varrimento que pode ser definida em função da frequência, $v = f\Delta E$ ^{69,71}.

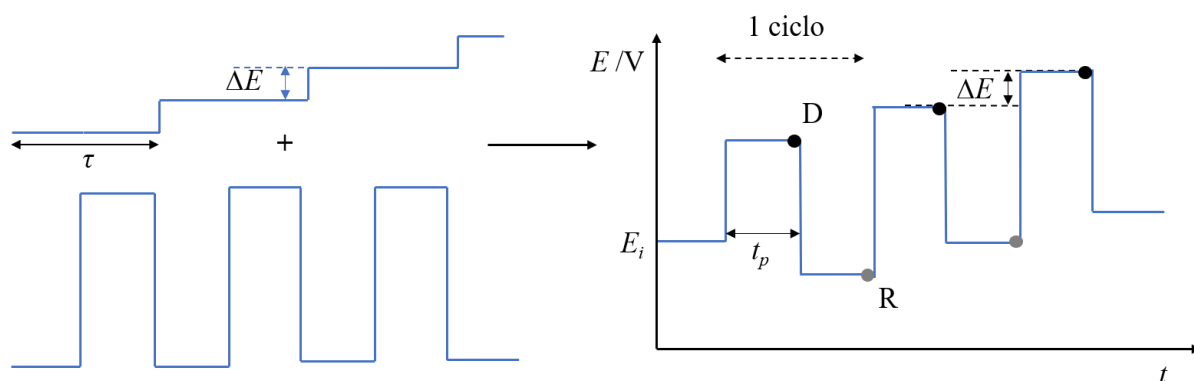


Figura 2.5: Forma da onda na voltametria de onda quadrada e respetivos parâmetros – adaptado da referência (19).

A corrente é retirada duas vezes por ciclo, no final de cada pulso. A corrente no sentido direto, i_d , é devida ao primeiro pulso do ciclo (ponto D, figura 2.5). A corrente retirada no sentido inverso, i_r , é retirada no fim do segundo pulso em cada ciclo (ponto R, figura 2.5). A diferença de corrente Δi é calculada como $i_d - i_r$. Nesta técnica é possível obter três voltamogramas, um com a corrente catódica, outro com a corrente anódica e ainda a diferença entre elas^{69,72}, como representado na figura 2.6. Esta técnica eletroquímica apresenta uma grande vantagem, uma vez que a corrente capacitiva pode ser minimizada. A corrente capacitiva tem um decaimento exponencial em função do tempo, enquanto que a corrente Faradaica é inversamente proporcional à raiz quadrada do tempo. Desta forma, como a

corrente capacitiva decai mais rápido e como a corrente é medida no final de cada pulso, esta componente é minimizada^{72,70}.

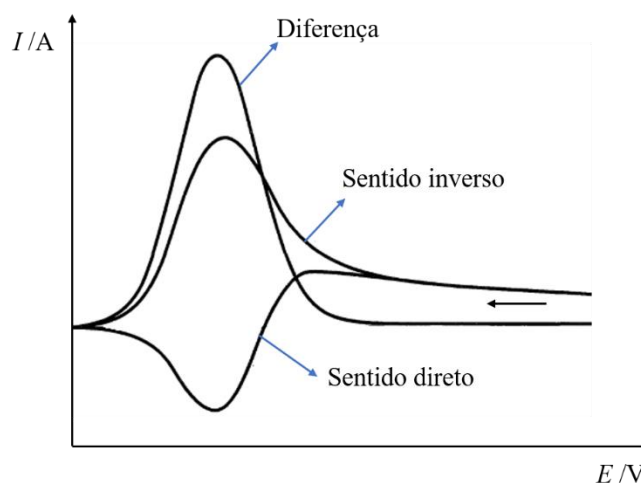
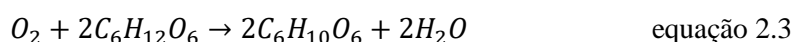
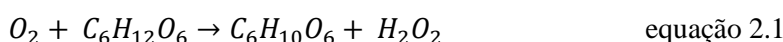


Figura 2.6: Voltamogramas obtidos por voltametria de onda quadrada, para um sistema reversível. Voltamogramas no sentido direto (corrente catódica), no sentido inverso (corrente anódica) e a diferença entre as duas correntes - adaptada da referência (69).

Remoção do oxigénio

O oxigénio é um interferente comum em biossensores com enzimas redutases, com o modo de transdução eletroquímico, uma vez que operam a potenciais negativos⁷³. Nesta gama de potenciais o oxigénio dissolvido na solução reduz-se a superóxido (O_2^-)⁶⁸, interferindo na deteção eletroquímica de vários analitos, como é o caso do nitrito. Para evitar a presença deste interferente, a célula eletroquímica pode ser borbulhada com um gás inerte, como o árgon ou azoto^{68,73}. Este método não é adequado para a análise de amostras no local. Este processo pode ser ultrapassado pela utilização de um sistema bioquímico, constituído pelas enzimas glucose oxidase (GOx) e catalase, juntamente com o substrato da primeira enzima, a glucose. Neste sistema, o oxigénio é reduzido pela oxidação catalítica da glucose pela enzima glucose oxidase (equação 2.1) e o peróxido de hidrogénio resultante da reação anterior é decomposto em oxigénio e água pela catalase (equação 2.2). As moléculas de oxigénio regeneradas na catálise são reduzidas novamente pela glucose oxidase (equação 2.3). Após adicionar a glucose oxidase, a catalase e a glucose, o oxigénio é removido eficazmente e os resultados podem ser comparados aos obtidos com o método de purga da célula com árgon, durante trinta minutos. A redução do peróxido de hidrogénio produzido poderia ocorrer, teoricamente, à superfície do eléctrodo, contudo a catalase assegura que a concentração de peróxido se mantém baixa o suficiente para evitar a sua deteção eletroquímica⁷³.



Procedimento experimental

Os ensaios de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada foram realizados com o potenciostato Autolab electrochemical Analyser (PGSTAT 12, Eco chemie) e pela utilização do *software* GPES (Eco chemie) versão 4.9. A célula eletroquímica foi colocada dentro de uma caixa de Faraday que permaneceu fechada durante a medição. A gama de potenciais está compreendida entre $-0,10$ a $-0,80$ V. A concentração de nitrito e cianeto a que foram realizados os ensaios estão apresentados nos resultados. Como eletrólito, foi utilizada uma solução tampão Tris-HCl 0,1 M com 0,1 M de KCl (pH=7,6). Para a remoção do oxigénio, a célula foi purgada durante 15 minutos com argon ou durante 5 minutos com o sistema bioquímico (0,76 mg/mL de GOx; 1 mg/mL de catalase; 80 mM de glucose). Nestas técnicas, utilizou-se como eléctrodo de referência o eléctrodo de Ag/AgCl e os eléctrodos de minas de grafite; para eléctrodo de trabalho utilizou-se grafite pirolítica (PGE), HBBICPE, HBKOHPE, 3BKOHPE e 3HKOHPE. Os voltamogramas obtido foram analisados no *software* Qsoas. A linha de base foi realizada pela função polinomial do *software*. Nos voltamogramas cíclicos antes de corrigir a linha de base, subtraiu-se o voltamograma correspondente ao branco (voltamograma sem a adição de nitrito). As regressões lineares e não lineares (hiperbólicas) foram realizadas pelo *software* *GrapPad Prim 4*.

2.2.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica

Considerações teóricas

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica muito sensível⁷⁴ que pode ser aplicada para o estudo de fenómenos que ocorrem na interface eléctrodo-solução⁷⁵, em particular, para a caracterização do comportamento resistivo de um eléctrodo na transferência de carga. Esta técnica consiste na aplicação de uma pequena perturbação sob a forma de uma onda sinusoidal, geralmente de potencial, no equilíbrio da célula eletroquímica¹⁹, que contém em solução as duas formas do par redox de uma espécie eletroativa⁶⁹. Os princípios para o conceito de impedância estão apresentados no anexo A. De um modo geral, a impedância, Z , que corresponde ao fator de proporcionalidade entre o potencial e corrente¹⁹, pode ser descrita por resistências e reactâncias em série⁶⁹. Desta forma, este parâmetro pode ser dividido numa componente resistiva, R , quando o potencial e a corrente estão em fase, e numa parte reactiva, $X_C = 1/\omega C$, onde a diferença de fase entre a corrente e o potencial é de 90° ^{19,69}. Genericamente, Z pode ser definida pela equação 2.4, onde Z' corresponde à componente real e Z'' corresponde à componente imaginária^{19,69}.

$$Z(\omega) = Z' - jZ'' \quad \text{equação 2.4}$$

$$Z' = R \quad \text{equação 2.5}$$

$$Z'' = 1/\omega C \quad \text{equação 2.6}$$

Qualquer célula eletroquímica pode ser representada por um circuito equivalente que inclui combinações de resistências e reactâncias¹⁹, onde passa corrente com a mesma amplitude e ângulo de fase que nas células eletroquímicas. Os elementos do circuito podem ser determinados pela análise dos diagramas de Nyquist (figura 2.4), que representam a componente imaginária (Z'') em função da componente real (Z'). No entanto, os circuitos equivalentes desenhados para uma célula eletroquímica não são únicos, podendo existir vários modelos para o mesmo fenómeno, especialmente em circuitos que representam sistemas complexos. O circuito equivalente de Randles, apresentado na figura 2.4 (b), é um dos circuitos frequentemente utilizados para a caracterização da célula eletroquímica⁶⁹. Este circuito é representado por uma resistência da solução, R_s , em série com um sistema em paralelo constituído por uma resistência à transferência de carga, R_{ct} , pela capacidade da dupla camada, C_{dl} , e pela impedância de Warburg, Z_W ^{75, 76}. Os elementos em paralelo são introduzidos devido ao facto de que a corrente total através da interface é o somatório das contribuições distintas dos processos Faradaicos e da carga da dupla camada. Como toda a corrente deve passar através de uma resistência da solução, R_s , este elemento é colocado em série no circuito equivalente. O processo Faradaico não pode ser representado por elementos ideais de um circuito, como o R_s e C_{dl} ⁶⁹. Uma forma de representar este processo é separar uma resistência pura, a resistência à transferência de carga (R_{ct}), de uma outra impedância, a impedância de Warburg (Z_W), que representa a resistência à transferência de massa.

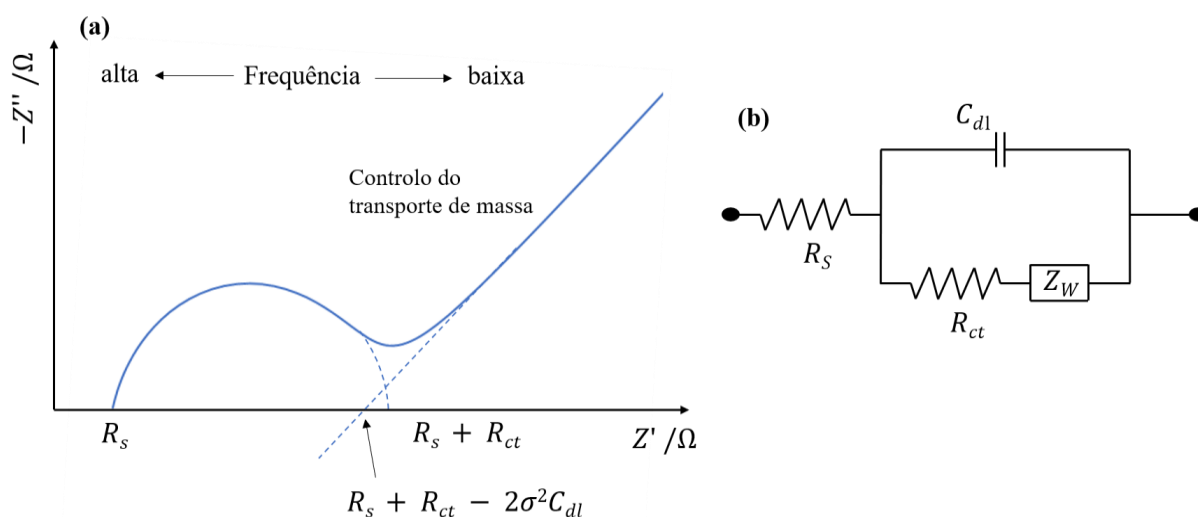


Figura 2.7: Diagrama de Nyquist (a) e correspondente circuito equivalente de Randles (b).

Procedimento experimental

Os ensaios realizados por espectroscopia de impedância eletroquímica foram obtidos através do potenciostato Electrochemical analyser (CHI604D, Serial 6E956) da CH Instruments e os dados foram adquiridos com o Electrochemical software CH instruments. A célula eletroquímica foi colocada dentro de uma caixa de Faraday e fechada durante a medição. Nos ensaios foram utilizados dois intervalos de frequência 1×10^5 a 0,005 Hz para a comparação entre todos os elétrodos de minas de grafite e 1×10^5 Hz a 0,01 Hz apenas para as minas da HB da BIC, ao potencial de equilíbrio de 0,2 V vs. SCE. Para calcular este valor antes de cada medição de impedância, traçou-se um voltamograma cíclico com a variação do potencial de -0,40 a 0,60 V, a 50 mV/s. Os valores de ΔE_p , i_p^a e i_p^c do correspondente

voltamograma cíclico foram obtidos pelo *software* de análise *QSoas*. O eletrólito utilizado foi uma solução tampão Tris-HCl 0,1 M e 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ com KCl 0,1 M (pH = 7,6). Foram estudados todos os elétrodos de trabalho de minas de grafite comerciais. O elétrodo de referência utilizado foi o elétrodo saturado de calomelanos, SCE (+ 0,045V vs. Ag/AgCl).

2.3. Microscopia de força atômica

Considerações teóricas

Em 1986 foi desenvolvido por Binning, Quate e Gerber, o microscópio de força atômica (AFM). Este é um microscópio mecânico⁷⁷, onde se pode retirar informações sobre a topografia da superfície da amostra, em três dimensões, pela monitorização, através de um sistema ótico, das interações de forças entre uma sonda e a amostra⁷⁸. Esta técnica não é restrita a amostras condutoras, o que permite a análise de todo o tipo de amostras, incluindo poliméricas e biológicas⁷⁷.

No AFM, a sonda é uma ponta afiada que está ligada na extremidade de um cantiléver flexível⁷⁸ e pode ser composta por silício ou nitreto de silício com uma forma piramidal ou cônica^{77,78}. O princípio do funcionamento do AFM está demonstrado na figura 2.8. As interações entre a ponta e a amostra provocam deflexões e torções no cantiléver, que são detetadas através da posição de um feixe laser refletido pelo mesmo. O feixe é refletido para um fotodíodo através de um revestimento metálico no topo da superfície do cantiléver^{69,77,79}. A amostra é colocada sobre um scanner piezoelétrico que durante a análise move-se de modo muito sensível nas posições x e y, por aplicação de uma pequena diferença de potencial. A posição z do cantiléver é controlada relativamente à superfície da amostra por um sistema de retroação que mantém a deflexão do cantiléver constante⁷⁹. Para obter as imagens topográfica em três dimensões, é necessário converter a deflexão do cantiléver (Δz) em força (F), através da constante de elástica de mola (c_z). Esta relação é dada pela lei de Hook⁷⁹:

$$F = c_z \times \Delta z \quad \text{equação 2.7}$$

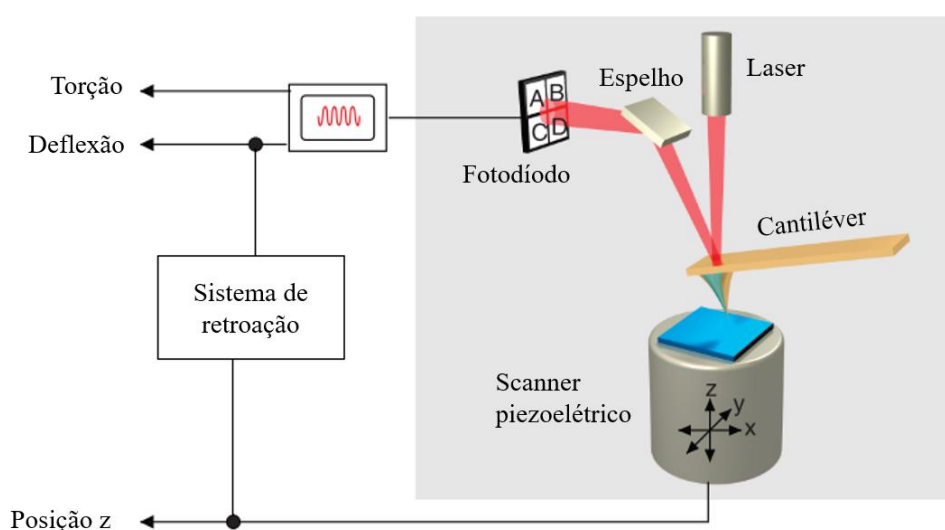


Figura 2.8: Princípios do funcionamento de um microscópio de força atômica - adaptado da referência (79).

O microscópio de AFM pode operar em três regimes de interação entre a ponta e a amostra: contacto, intermitente (*tapping*) ou não contacto. No modo de contacto, dominam as forças repulsivas interatômicas de curto alcance⁷⁸. Nesta situação, a ponta é colocada em contacto com a amostra, que permite obter imagens topográficas de superfícies com variações de altura. Contudo, a ponta pode ser danificada ou pode deformar materiais mais maleáveis (como materiais biológicos e poliméricos). No modo de não contacto, a ponta é colocada próxima à amostra (não existe contacto mecânico) e está sujeita a forças atrativas de longo alcance, nomeadamente magnéticas e elétricas que se estabelecem entre a ponta (magnetizada e/ou condutora) e amostra. No modo intermitente (*tapping*), o cantiléver oscila a uma frequência de ressonância elevada⁷⁷ e é periodicamente colocado em contacto com a amostra ao fim de um ciclo de oscilação⁷⁸. Este modo, permite obter informações adicionais como imagens de diferença de fase através das mudanças na amplitude da oscilação da ponta, provocada pelas interações com a amostra⁷⁷.

Detalhes Experimentais

As imagens topográficas foram obtidas por AFM num microscópio Multimode 8HR Bunker, em modo de *Peak Force Tapping* AFM (PFT-AFM). As imagens foram adquiridas a uma velocidade de varrimento de ≈ 1.0 Hz, em condições ambientais (≈ 21 °C), e recorrendo a sondas *ScanAsyst-Air silicon probes* (Bruker) com uma constante elástica de mola de 0.4 N/m. Por AFM foram analisadas as minas HB da BIC e da KOH-I-NOOR. As amostras foram cortadas com aproximadamente 5 mm de altura e de seguida polidas da mesma forma que os elétrodos. Além das minas não modificada também se estudou a imobilização da enzima redutase do nitrito antes e após lavagem com o tampão Tris-HCl 0,1 M e KCl 0,1 M (pH = 7,6). Nesta situação foi colocada na superfície da mina 1 μ L da solução de enzima.

2.4. Microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de raios X por dispersão de energia

Considerações teóricas

A microscopia eletrónica de varrimento é uma técnica utilizada para estudar a morfologia das superfícies, como por exemplo a superfície de elétrodos,¹⁹ de vários materiais, entre eles o carbono⁸⁰. O microscópio é constituído por um canhão, que produz os eletrões, uma coluna com um sistema de lentes (que leva o feixe de eletrões até à amostra) e um detetor, que deteta os eletrões secundários e retrodifundidos gerados através da interação do feixe inicial com a amostra⁸⁰. Geralmente, a emissão dos eletrões dá-se através do aquecimento de um filamento de tungsténio e a análise é realizada sob condições de vácuo⁸¹. De forma a impedir a acumulação de carga na superfície da amostra, quando a amostra não é metálica, deve ser pulverizada com um filme metálico, em particular o ouro¹⁹.

Os fótons de raios X são também obtidos pela interação da superfície da amostra com o feixe de eletrões, que têm comprimentos de onda e energias dependentes da identidade do elemento e do nível eletrónico que causa a sua emissão. A análise destes fótons pode dar uma composição química local da superfície e podem ser detetados por um espectrómetro dispersivo de energia (EDS) que contém um

analisador de canais múltiplos, geralmente acoplada ao SEM. Os picos obtidos no espectro podem ser atribuídos a elementos específicos e às respectivas percentagens de cada um na amostra¹⁹.

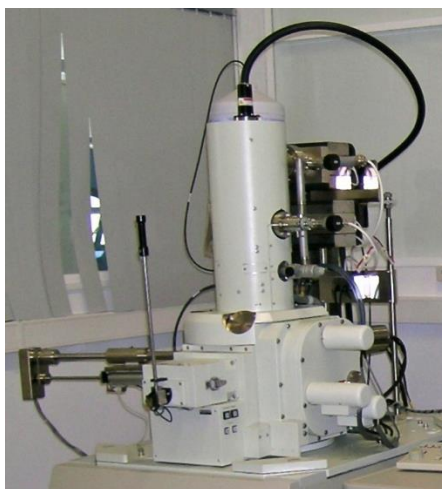


Figura 2.9. SEM/EDS do MicroLab *Electron microscopy laboratory* do Instituto Superior Técnico de Lisboa.

Detalhes experimentais

As análises por SEM/EDS foram efetuadas no MicroLab *Electron microscopy laboratory* do instituto superior técnico de lisboa, com um microscópio de varrimento eletrónico da Hitachi S2400 acoplado a um detetor dispersivo de energia da Bruker *light elements*. Foram analisadas as quatro minas em estudo. Previamente, as minas cortadas foram polidas tal como os elétrodos, e pulverizadas com carbono.

2.5. Difração de raios X

Considerações teóricas

A difração de raios X é uma técnica não destrutiva⁸², muito utilizada no estudo da estrutura da rede cristalina e no espaçamento atómico de diversos materiais, entre eles a grafite⁸³. Os raios X, produzidos por um cátodo, são direcionados para a amostra que ao interagirem com a mesma produzem uma interferência construtiva (e um raio difratado) cujas condições satisfazem a lei de Bragg (equação 2.8). Esta lei relaciona o comprimento de onda de uma radiação eletromagnética (λ) com o ângulo de difração (2θ) e o espaçamento de rede numa amostra cristalina (d_{hkl})⁸⁴. Os raios X difratados pelo conjunto de planos (hkl), ilustrado na figura 2.10, apresentam um valor de 2θ característico e consequentemente um conjunto único de espaçamento de rede, permitindo a identificação do mineral⁸⁴.

$$\lambda = 2d_{hkl}\sin(\theta) \quad \text{equação 2.8}$$

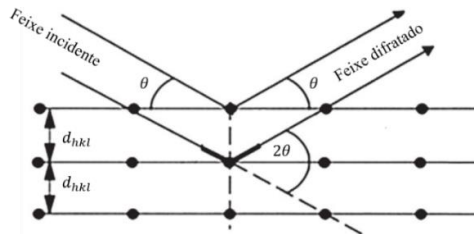


Figura 2.10: Difração de raios X dos planos de uma rede cristalina - adaptado da referência (85).

Detalhes experimentais

Os ensaios de difração de pós de raios X foram realizados pela Doutora Ana Mourato, num difractómetro da Philips (PW 1710) com aquisição de dados automáticos pelo software APD Philips v3, 6B e com a radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,15406 \text{ nm}$) a 40 kV/ 30mA. As minas HB da BIC e HB e 3B da Koh-I-Noor foram moídas num almofariz de ágata (cerca de 1 cm de mina) e o espectro de raios X foi obtido numa gama de 2θ de 7-90°, com um degrau de 0,0170°.

Capítulo 3:

Análise e discussão dos resultados

3. Análise e discussão dos resultados

3.1. Caracterização dos elétrodos de minas de grafite

3.1.1. Estrutura e composição

Os elétrodos de minas propostos para o desenvolvimento do biossensor de cianetos, como mencionado anteriormente, são constituídos pelas minas HB da BIC (HBBICPE) e 3B (3BKOHPE), HB (HBKOHPE) e 3H (3HKOHPE) da KOH-I-NOOR. Este material compósito, constituído essencialmente por grafite e argila, pode apresentar composição e estrutura variáveis de acordo com a dureza e fabricante²³. Assim, é de todo o interesse avaliar estes fatores, uma vez que condicionam a eficiência da transferência eletrónica²². Para tal, a morfologia da superfície das minas, apresentada na figura 3.1, foi obtida por SEM. Ao comparar a topografia das quatro minas verifica-se que não existe uma diferença significativa, com exceção da mina 3H que apresenta uma superfície ligeiramente mais lisa do que as restantes. Além disso, é possível observar, na superfície das minas, marcas evidentes do polimento das mesmas (figura 3.1, (c) e (d)).

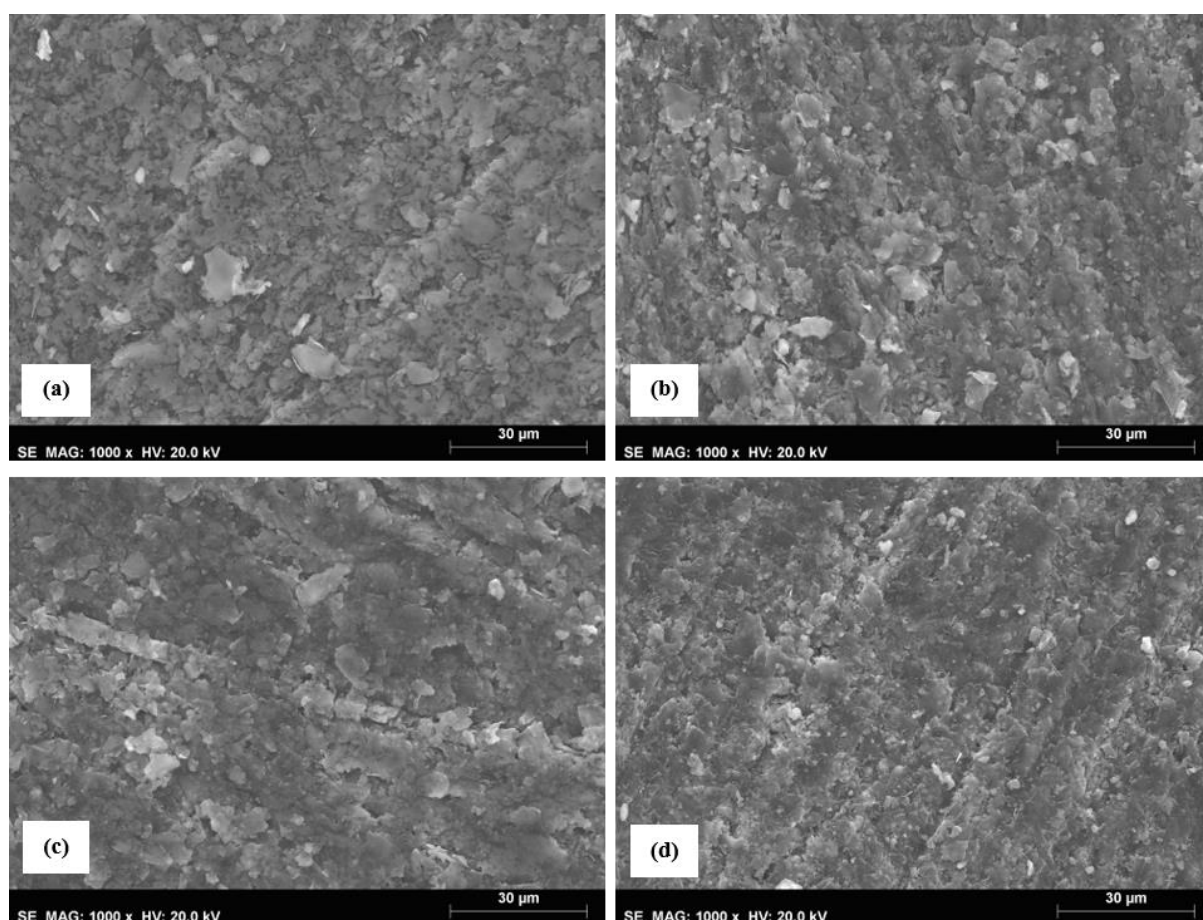


Figura 3.1: Imagens obtidas por SEM com uma ampliação de 1000 para os elétrodos de minas propostos: HBBICPE (a), HBKOHPE (b), 3BKOHPE (c) e 3HKOHPE (d).

A análise elementar das minas de grafite comercial foi efetuada por EDS (tabela 3.1) para uma determinada área representativa das superfícies em estudo. Por esta técnica identificou-se a presença de carbono, oxigénio, silício, alumínio, ferro, titânio, cálcio, potássio e magnésio. Apesar de não se ter verificado nenhuma diferença significativa, por SEM, em relação à morfológica da superfície das minas, ao nível da composição química estas minas apresentam ligeiras diferenças. Na percentagem, em massa, para o elemento carbono, verifica-se que a mina HB da BIC apresenta um valor mais elevado (ca. 75 %), sendo mais semelhante à mina 3B da KOH-I-NOOR (ca. 74 %). Contudo, a mina da marca BIC apresenta uma percentagem de ferro mais elevada (ca. 4 %) e o alumínio (ca. 4 – 5 %) e oxigénio (ca 13 – 18 %) estão em maior quantidade nas minas da KOH-I-NOOR. A presença destes elementos, bem como de Si, Ca, Mg, Ti e K, dependem principalmente da argila utilizada para a produção das minas de grafite. Assim sendo, por comparação com os dados da literatura, uma das hipóteses para a argila utilizada é o caulim. Este mineral é comum na produção destes materiais compósitos^{86,87} e é constituído essencialmente por caulinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) e por outros óxidos como SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , TiO_2 , K_2O , MgO e CaO ⁸⁸.

Tabela 3.1: Composição e valores da percentagem em massa de cada elemento presente nas minas de grafite comerciais, obtida pela análise de uma área da superfície por EDS.

Elemento	HB BIC	3B KOH	HB KOH	3H KOH
C	75,00	73,56	68,17	67,51
O	11,20	13,48	18,16	18,13
Si	5,17	5,79	6,22	6,89
Al	2,92	4,09	5,45	5,45
Fe	4,28	1,68	1,22	1,04
Ti	0,53	0,44	0,19	0,21
Ca	0,63	0,34	0,10	0,16
K	0,15	0,51	0,37	0,35
Mg	0,10	0,12	0,11	0,26

Seguidamente, os materiais compósitos foram analisados por difração de raios X. Considerando os resultados obtidos por EDS esta análise foi efetuada para as minas HB da BIC e 3B e HB da KOH-I-NOOR. No espetro de difração obtido, apresentado na figura 3.2, não se observou diferenças significativas entre os três materiais propostos para elétrodo de trabalho. A comparação com dados reportados na literatura^{21,83,89} permitiu atribuir no difratograma obtido os picos referentes aos planos de rede cristalina da grafite. Em relação à argila (caulim) não foi possível identificar a presença de algum pico de difração característico deste mineral. Os picos difratados indicam dois tipos de estrutura da rede cristalina da grafite utilizada nas minas comerciais. Um dos arranjos atômicos é referente a uma estrutura hexagonal. Esta estrutura é representada pela presença dos planos de rede cristalina (002), (004) e (006), difratados com um ângulo 2θ de 27° , 55° e 78° respetivamente, que correspondem aos planos basais da grafite. Além disso, o plano (101), para $2\theta = 45^\circ$, reflete a estrutura a três dimensões da rede

hexagonal^{21,83}. Em contrapartida, observou-se também a presença de um plano (101)* a 43°, característico de um arranjo espacial romboédrico entre os átomos de carbono. Esta forma é termodinamicamente instável e transforma-se progressivamente num empacotamento hexagonal, para temperaturas acima de 1300°C, sendo esta estrutura cristalina característica da grafite de origem natural²¹. Esta constatação é corroborada pelo espaçamento entre os planos basais (002). O valor do espaçamento entre os planos foi determinado pelo software APD Philips v3 6B a partir da lei de Braag. As minas HB da BIC, HB e 3B da KOH-I-NOOR apresentam um espaçamento de 0,3348 nm, 0,3359 nm e 0,3367 nm, respectivamente. Estes valores, estão próximos dos determinados para a grafite natural, compreendidos entre 0,3354 a 0,3356 nm, dependendo da origem do mineral²¹. As ligeiras diferenças entre elas podem ser devidas à origem da própria grafite e ao processo de aquecimento a que são submetidos para a produção das minas. Adicionalmente, importa referir que o espectro de difração de raios X para a mina 3B da KOH-I-NOOR apresenta uma maior intensidade nos picos de difração (figura 3.2 (a)), indicando que existe uma maior quantidade de planos de rede que provocou uma maior intensidade dos raios X difratados. Ao avaliar não só a superfície da mina, mas sim a sua composição numa porção da mesma, constata-se que a quantidade de carbono presente na superfície pode variar ao longo do seu comprimento, apresentando uma composição heterogénea em relação a este elemento.

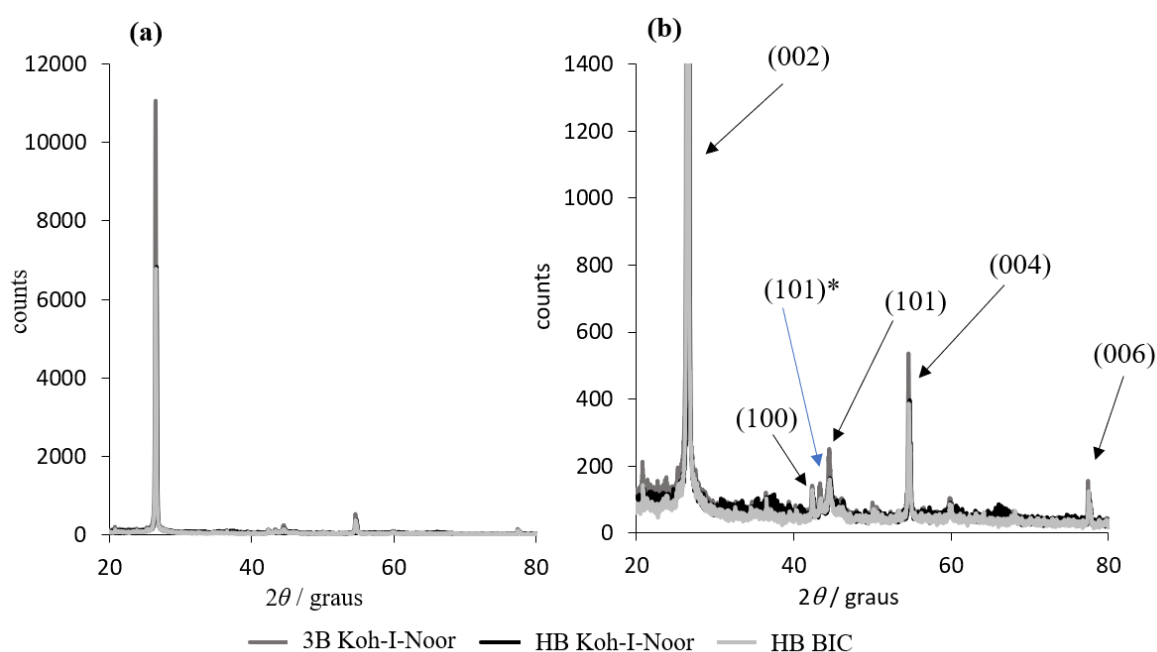


Figura 3.2: Espectro de dispersão de raios X das minas comerciais (a) e respetiva ampliação do espectro (b).

3.1.2. Desempenho da grafite como material de eletrodo

A transferência eletrônica entre o transdutor e a enzima é um dos aspectos fundamentais no desenvolvimento de biossensores. Para escolher o material transdutor mais adequado para o biossensor, ou seja, o eletrodo que apresente uma transferência eletrônica mais rápida, estudou-se por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, na presença da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, o comportamento eletroquímico dos quatro tipos de eletrodos de minas, estudados anteriormente. O eletrólito escolhido para a realização dos ensaios eletroquímicos foi igual ao utilizado posteriormente para o estudo da resposta do biossensor ao nitrito e cianeto (Tris-HCl 0,1 M; KCl 0,1 M; pH = 7,6).

Por voltametria cíclica, determinou-se os valores de ΔE_p , apresentados na tabela 3.2, que são um indicador da velocidade de transferência eletrônica, atendendo a que quanto maior for o seu valor mais lenta será a transferência eletrônica⁹⁰. Os voltamogramas da figura 3.3 apresentam a comparação entre os quatro tipos de eletrodos. O eletrodo HBBICPE apresenta uma transferência eletrônica mais rápida do que os restantes eletrodos em estudo. Neste eletrodo, obteve-se um valor de $\Delta E_p = 0,082 \pm 0,001$ V, que corresponde ao valor mais próximo do esperado, para um processo reversível, controlado por transferência de massa, 0,057 V (ver capítulo 2, secção 2.2.2). Curiosamente, o eletrodo HBKOHPE, de igual dureza ao HBBICPE, corresponde ao eletrodo com o pior desempenho ao nível da transferência eletrônica, onde o $\Delta E_p = 0,33 \pm 0,03$ V. Os eletrodos 3BKOHPE ($\Delta E_p = 0,11 \pm 0,02$ V) e 3HKOHPE ($\Delta E_p = 0,15 \pm 0,01$ V) apresentam um valor de ΔE_p mais próximo entre eles, embora o eletrodo 3HKOHPE apresente uma maior dureza. A quantidade de espécie que foi oxidada é igual à que foi reduzida, de acordo com o esperado para esta sonda redox, dado que o módulo da razão i_p^a/i_p^c obtido foi próximo de 1 para todos os eletrodos de minas (tabela 3.2). Em relação aos eletrodos HBBICPE, os ensaios foram realizados para três eletrodos com minas diferentes, com origem em duas embalagens compradas no mesmo momento e local. Consegue-se obter um comportamento eletroquímico semelhante, com os picos catódico e anódico bem resolvidos, (gráfico (b) da figura 3.3) e com uma boa reprodutibilidade, considerando os baixos desvios padrão obtidos para o ΔE_p e o módulo da razão i_p^a/i_p^c .

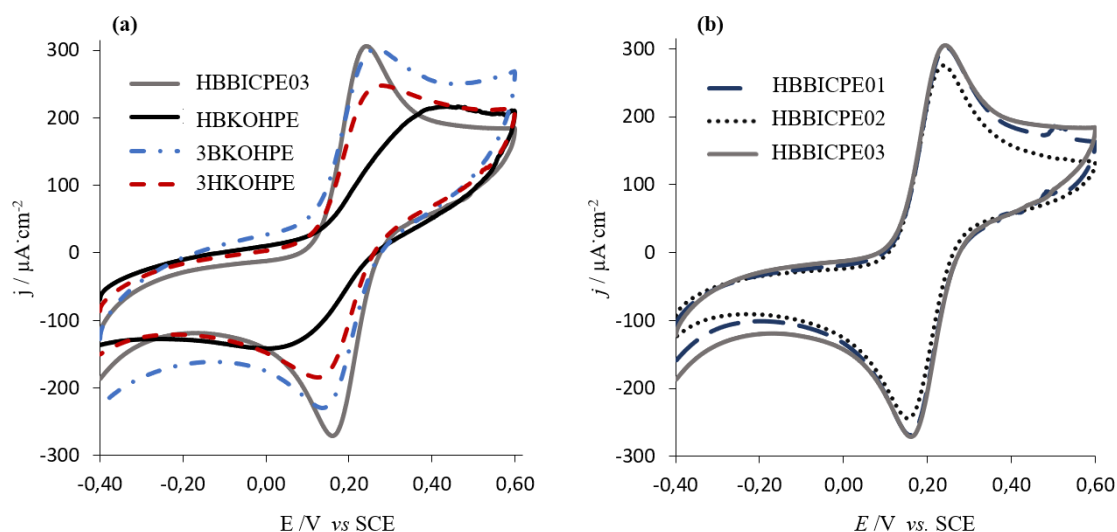


Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos do sistema com 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, dos eletrodos de minas de grafite comerciais ($A = 0,0314 \text{ cm}^2$), em tampão tris-HCl 0,1M (pH = 7,6) e KCl 0,1 M, a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s. (a) comparação entre os quatro tipos de eletrodos e (b) Triplicados do eletrodo HBBICPE.

Pela análise de EIS, obteve-se os respectivos diagramas de Nyquist dos elétrodos de minas comerciais, apresentados no gráfico (c) da figura 3.4. De acordo com os diagramas obtidos, verifica-se que os elétrodos HBBICPE e 3BKOHPE apresentam um comportamento semelhante comparativamente com os outros dois elétrodos de minas, 3HKOHPE e o HBKOHPE, os quais representam sistemas mais complexos. Os diagramas obtidos apresentaram dois ou mais semicírculos, com resistências à transferência de carga distintas, indicando que os constituintes das minas apresentam propriedades condutoras diferentes. Considerando que, uma reação rápida é caracterizada por uma resistência à transferência de carga pequena⁶⁹, estes valores são também uma indicação da velocidade da transferência eletrônica. Assim, para obter os valores de resistência, os dados obtidos por EIS foram ajustados pelo software da *CH instruments*, para um determinado circuito elétrico de modo a obter um menor erro no ajuste. Os circuitos equivalentes propostos para cada eletrodo foram obtidos através da modificação do circuito de Randles (ver capítulo 2, seção 2.2.3). Por cada semicírculo, acrescentou-se uma resistência à transferência de carga em paralelo com a capacidade da dupla camada. Como no diagrama, o segundo semicírculo culmina numa linha reta associada ao controle do transporte de massa, para frequências baixas, colocou-se no circuito o elemento correspondente à impedância de Warburg (Z_w) em série com a resistência à transferência de carga. Desta forma, para os elétrodos HBBICPE, 3BKOHPE e HBKOHPE, que apresentam dois semicírculos, propôs-se o circuito equivalente (b) da figura 3.4, enquanto que para o eletrodo 3HKOHPE, como apresenta três semicírculos, o circuito mais indicado para o ajuste foi o (c).

Nestes ajustes considerou-se a dupla camada do eletrodo como um condensador puro. Contudo, os diagramas obtidos para os elétrodos de minas refletem sistemas complexos, que poderão não ser adequadamente ajustados a um condensador puro. Uma alternativa para substituir este elemento do circuito quando há desvios à idealidade é utilizar um elemento de constante de fase (CPE). Este elemento, que representa uma capacidade dependente da frequência, é frequentemente imposto ao circuito equivalente quando o eletrodo apresenta uma superfície irregular⁹¹, como é o caso das minas de grafite. Porém, ao substituir no circuito equivalente o condensador puro pelo CPE, os resultados dos ajustes foram mais desviados dos diagramas obtidos experimentalmente, ou seja, com um erro de ajuste mais elevado, indicando que também não permite uma boa correlação para com o que acontece na dupla camada dos elétrodos de minas de grafite. Posto isto, ajustaram-se os dados a um condensador puro e considerou-se os valores obtidos para a resistência à transferência de carga como valores aproximados, principalmente para as minas 3H e HB da KOH-I-NOOR.

Em relação ao primeiro semicírculo, os valores estimados de R_{CT} , apresentados na tabela 3.2, estão dentro da mesma grandeza, para o HBBICPE, 3BKOHPE e HBKOHPE, compreendidos entre 114 - 125 Ω . Para o eletrodo 3HKOHPE este valor é mais elevado, cerca de 287 Ω . No segundo semicírculo existe uma diferença considerável nos valores estimados de R_{CT} que se encontram entre 267 - 8004 Ω . Em suma, os elétrodos menos resistivos, correspondem ao HBBICPE e 3BKOHPE e os elétrodos mais resistivos, correspondem ao 3HKOHPE e o HBKOHPE. Estes resultados obtidos por EIS estão de acordo com os obtidos por voltametria cíclica. A maior parte das investigações sobre elétrodos de lápis de grafite não referem nem a dureza nem a marca, pelo que não são boas referências para comparar com os dados obtidos. No entanto, além dos ensaios realizados nos elétrodos de minas, foi efetuado um ensaio, em iguais condições, com uma grafite policristalina pura ($A = 0,88 \text{ cm}^2$), cujos dados de EIS (figura 6.5, anexo B) foram ajustados para o circuito de Randles (seção 2.2.3). Para este tipo de material de grafite, o valor de resistência à transferência de carga foi de 18 Ω . Em comparação com os elétrodos de minas, este valor é bastante inferior. Assim, constata-se que os constituintes da argila das minas, conferem propriedades pouco condutoras, o que provoca um aumento considerável da R_{CT} . Além disso, os elétrodos, que apresentavam uma percentagem maior de oxigénio, silício e alumínio, em particular o HBKOHPE e o 3HKOHPE, tal como confirmado por EDS, tiveram um pior desempenho ao nível da

transferência eletrônica, tanto por voltametria cíclica como por espectroscopia de impedância eletroquímica. Desta forma, considerando os resultados obtidos por CV e EIS, é possível estabelecer a seguinte relação para o desempenho dos elétrodos no respeitante à transferência eletrônica: HBBICPE > 3BKOHPE > 3HKOHPE > HBKOHPE.

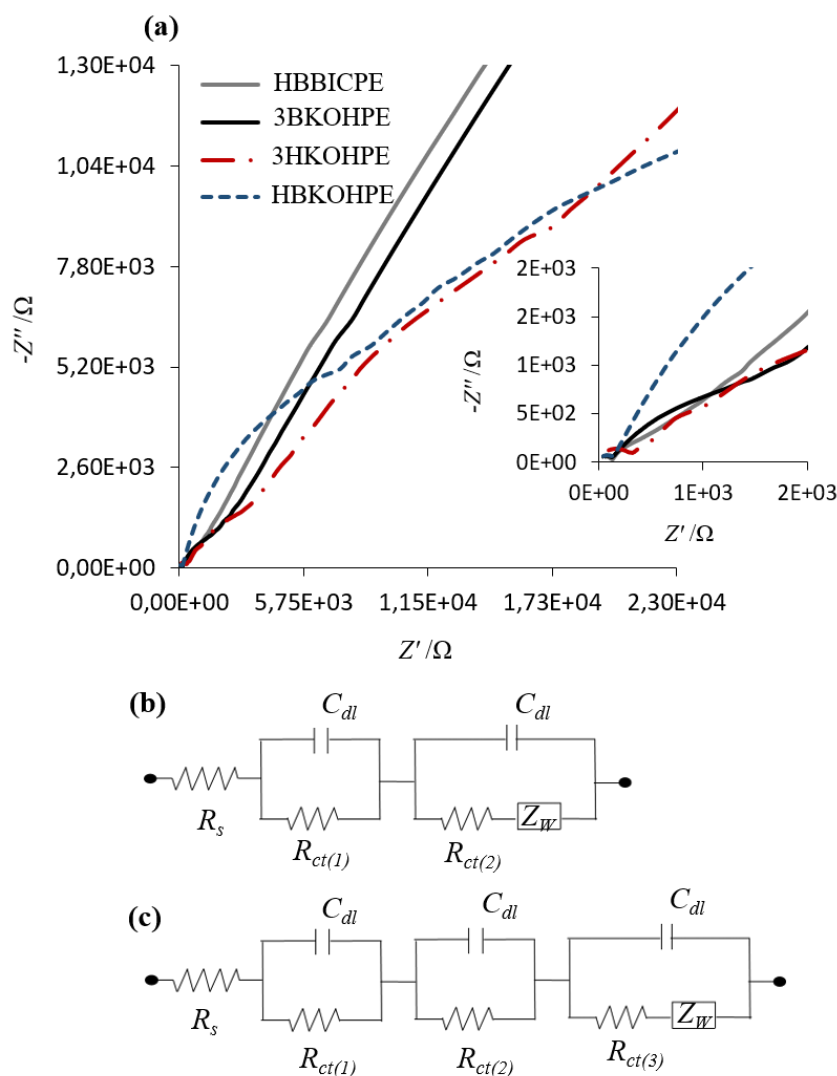


Figura 3.4: Resultados obtidos por EIS: (a) Diagrama de Nyquist dos elétrodos em estudo, para uma frequência de 1×10^5 a 0,005 Hz, no potencial de equilíbrio 0,2 V, em tris-HCl 0,1 M (pH = 7,6), KCl 0,1 M e 1 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$. (b) circuito equivalente proposto para os elétrodos HBBICPE, 3BKOHPE e HBKOHPE; (c) circuito equivalente proposto para o elétrodo 3HKOHPE.

Tabela 3.2: Valores de ΔE_p observados por voltametria cíclica e valores aproximados de resistência à transferência de carga obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica, dos elétrodos de mina de grafite comercial, com respectivo erro do ajuste dos dados obtidos ao circuito equivalente.

CV			EIS			
WE	$\Delta E_p / V$	$ i_p^a / i_p^c $	$R_{CT(1)} / \Omega$	$R_{CT(2)} / \Omega$	$R_{CT(3)} / \Omega$	erro
HBBICPE	$0,082 \pm 0,001^a$	$1,04 \pm 0,02^a$	125 ^c	267 ^c	-	0,05 ^c
3BKOHPE	$0,11 \pm 0,02^b$	$1,01 \pm 0,05^b$	114	720	-	0,1
3HKOHPE	$0,15 \pm 0,01^b$	$1,02 \pm 0,03^b$	287	1786	5848	0,1
HBKOHPE	$0,33 \pm 0,03^b$	$1,09 \pm 0,01^b$	119	8004	-	0,2

a) Valores obtidos a partir de 3 minas diferentes; b) Valores obtidos a partir de 3 medições com a mesma mina; c) Valores obtidos para um dos elétrodos HBBICPE

Polimento dos elétrodos HBBICPE

Comparando os resultados experimentais obtidos por difração de raio X e EDS, verifica-se que a composição dos elétrodos é heterogênea ao longo do comprimento da mina. Desta forma, estudou-se o comportamento dos elétrodos HBBICPE, quando a sua superfície é polida novamente apenas por espectroscopia de impedância eletroquímica, que é uma técnica mais sensível a alterações da composição condicionantes das propriedades condutivas da interface⁹². A título de exemplo, estão apresentados na figura 3.5, os diagramas de Nyquist obtidos para dois dos elétrodos de minas HB da BIC, com dois polimentos da superfície. Os valores da resistência à transferência de carga, apresentados na tabela 3.3, foram estimados para três minas recorrendo ao circuito (b) da figura 3.4. Para o primeiro semicírculo os valores de R_{ct} variam entre 106 - 117 Ω , não revelando diferenças significativas entre polimentos. Porém, o segundo semicírculo apresenta grandes diferenças nos valores de R_{ct} que variam de acordo com o polimento e de acordo com o eléctrodo, sendo os valores compreendidos entre 688-1410 Ω . De acordo com estes resultados verifica-se que não há uma correlação entre polimento e aumento ou diminuição da resistência à transferência de carga. Estes resultados, confirmam, mais uma vez, que após cada polimento a superfície do eléctrodo pode apresentar algumas diferenças na composição química, o que influencia as propriedades condutoras dos elétrodos. No entanto, como se verificará nas secções seguintes (3.2 e 3.3) estas diferenças na composição e condutividade não provocaram alterações significativas na resposta dos biossensores.

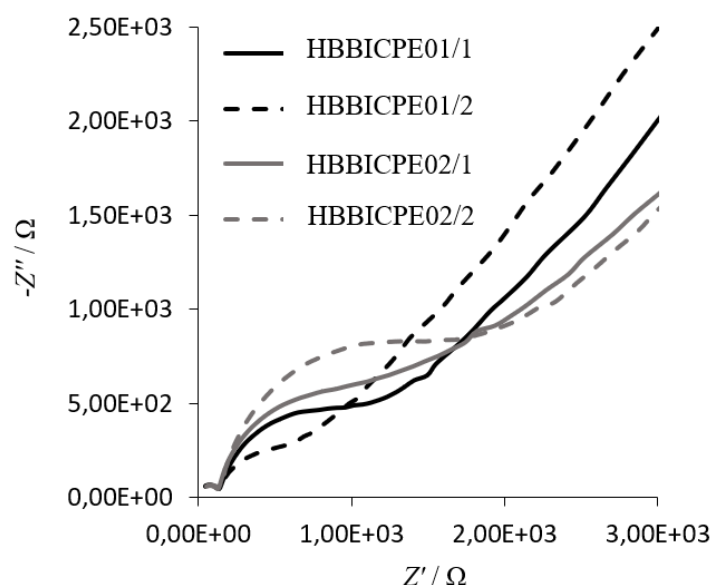


Figura 3.5: Diagramas de Nyquist, em tris-HCl 0,1M (pH=7,6), KCl 0,1M e 1 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$, para dois elétrodos HBBICPE, polidos duas vezes. A linha contínua representa o primeiro polimento (HBBICPE/1) e a linha descontinua representa o segundo polimento do elétrodo (HBBICPE/2). Ensaios realizados com uma frequência de 1×10^5 a 0,01 Hz, no potencial de equilíbrio 0,2 V.

Tabela 3.3: Valores da resistência à transferência de carga obtidos para dois polimentos dos elétrodos HBBICPE em estudo, e respetivo erro do ajuste ao circuito (b) da figura 3.2.

Elétrodo/polimento	$R_{CT(1)} / \Omega$	$R_{CT(2)} / \Omega$	Erro
HBBICPE01/1	117	688	0,04
HBBICPE01/2	116	322	0,04
HBBICPE02/1	106	935	0,08
HBBICPE02/2	116	1410	0,09
HBBICPE03/1	108	533	0,07
HBBICPE03/2	116	1132	0,1

3.1.3. Imobilização da enzima

Como mencionado no capítulo 1, o método de imobilização por adsorção baseia-se em interações fracas entre a enzima e o transdutor, existindo a possibilidade da dessorção da enzima¹⁷, quer quando o elétrodo é lavado quer durante a sua utilização. Por esse motivo, estudou-se, a imobilização da enzima redutase do nitrito ccNiR na superfície das minas HB da BIC e KOH-I-NOOR por microscopia de força atômica (AFM) e por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

Em primeiro lugar, analisou-se por AFM, a topografia das minas HB da BIC e KOH-I-NOOR, antes e após a modificação com a enzima, tal como representado na figura 3.6. Antes da modificação, a mina HB da BIC apresenta uma superfície mais uniforme, com terraços mais lisos, enquanto que a mina da KOH-I-NOOR apresenta uma superfície bastante irregular, o que não foi possível averiguar por SEM. Após a imobilização da enzima ccNiR, por adsorção, observou-se que no caso da mina HB da BIC, a superfície fica totalmente coberta, com aglomerados globulares, característica da presença da enzima. No caso da mina HB da KOH-I-NOOR, observou-se igualmente a presença da enzima ccNiR, contudo

foram identificadas algumas áreas descobertas, como na imagem (e) da figura 3.6. Tal facto pode ser devido a uma menor afinidade da enzima para com determinadas zonas da superfície das minas.

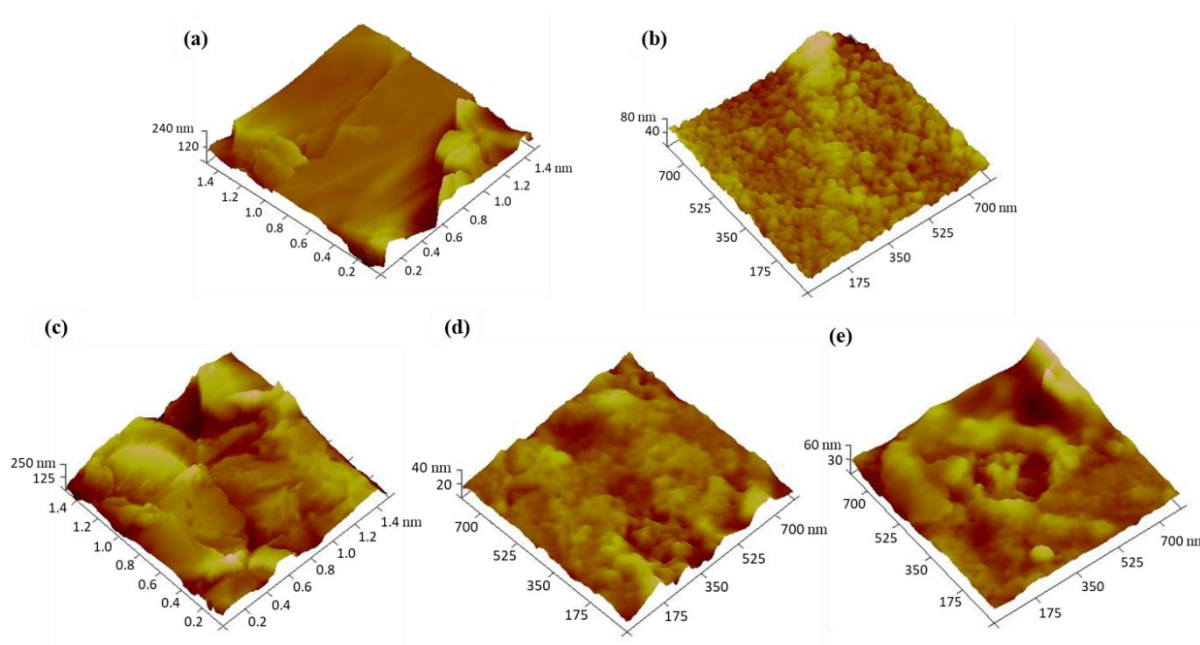


Figura 3.6: Imagens topográficas obtidas por AFM para a mina HB da BIC sem enzima (a) e modificada com a ccNiR (b) e HB Koh-I-Noor sem enzima (c) e modificada com a ccNiR (d) e (e).

Seguidamente, estudou-se o efeito da lavagem do eléctrodo com tampão Tris-HCl 0,1 M e KCl 0,1 M. Nas imagens topográficas obtidas e ilustradas na figura 3.7, identificou-se a presença de áreas descobertas na mina HB da BIC, e praticamente não se verifica a presença da enzima para a mina da KOH-I-NOOR. Também, por EIS, se verificou a presença da proteína na superfície do eléctrodo, após adsorção. Com efeito, ao modificar a superfície do transdutor com a enzima ccNiR forma-se um filme de proteína (não condutor) que dificulta a transferência eletrónica heterogénea, levando a um aumento da resistência à transferência de carga, que se reflete no aumento significativo do diâmetro do semicírculo, como se verifica pelo diagrama de Nyquist representado na figura 3.8.

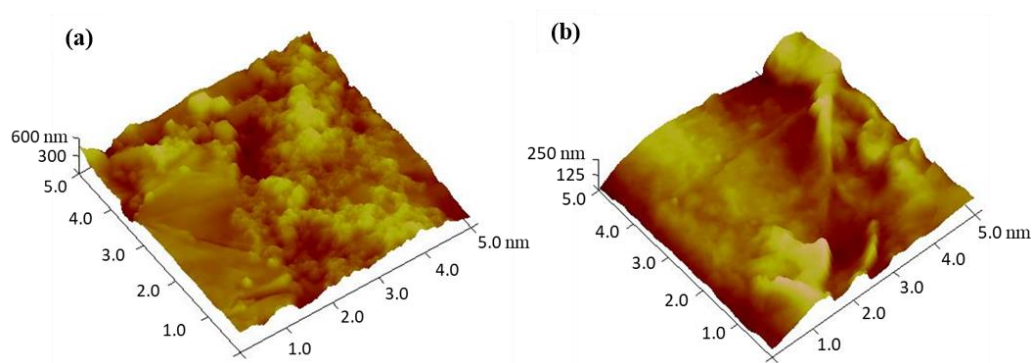


Figura 3.7: Imagens topográficas obtidas por AFM das minas HB da BIC (a) e KOH-I-NOOR (b) modificadas com enzima após lavagem com tampão 0,1 M Tris-HCl e KCl 0,1 M, pH=7,6.

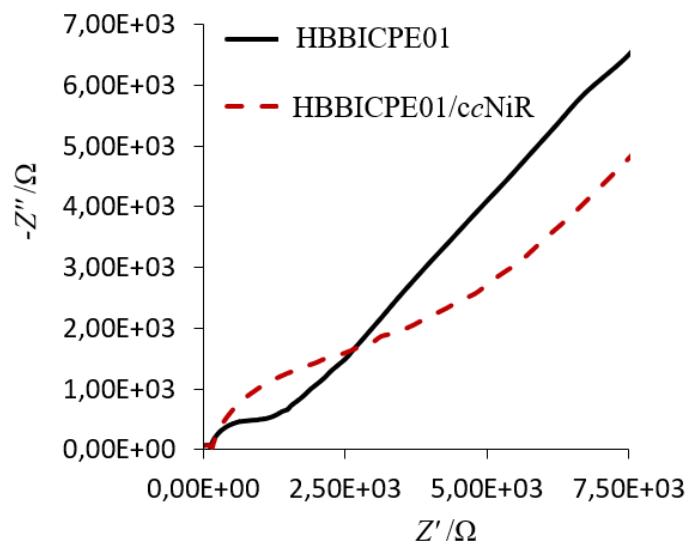


Figura 3.8: Diagrama de Nyquist do eléctrodo HBBICPE antes e após a modificação com a enzima ccNiR. Frequência de 1×10^5 a 0,005 Hz e amplitude de 10 mV, no potencial de equilíbrio 0,2 V, em tris-HCl 0,1 M (pH=7,6), KCl 0,1 M e 1 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$.

3.2. Desempenho do biossensor para a detecção de nitrito

3.2.1. Eléctrodo de grafite pirolítica modificado com a enzima ccNiR

A enzima ccNiR é capaz de reduzir o nitrito por transferência electrónica directa quando imobilizada em eléctrodos de grafite pirolítica. Por esse motivo, este material transdutor tem sido vastamente explorado no estudo da actividade catalítica da enzima ccNiR^{55,64-67}. Como tal, para efeitos comparativos, antes de utilizar os eléctrodos de minas modificados, optou-se por avaliar a actividade catalítica da ccNiR usando o eléctrodo PGE com o plano *edge*, por voltametria cíclica. O esquema representado na figura 1.8 (capítulo 1, secção 1.3.2), mostra o mecanismo reacional. À medida que o eléctrodo reduz a enzima ccNiR, esta catalisa a redução do nitrito a amónio. Após a reacção catalítica, a enzima fica no estado oxidado e é reduzida novamente pelo eléctrodo, num novo ciclo catalítico. À medida que a concentração de substrato aumenta, o fluxo de electrões (corrente) devido à redução da enzima, também aumenta. Este fenómeno traduz-se num aumento da densidade de corrente do pico catódico, observado a partir de $-0,37$ V vs. Ag/AgCl que se desvia para valores mais negativos consoante o aumento da concentração de nitrito, tal como se pode ver nos voltamogramas cíclicos da figura 3.9 (a).

Ao representar o valor da densidade de corrente catalítica, no potencial do pico catódico, em função da concentração de substrato, verifica-se que a reacção catalítica segue uma cinética de Michaelis-Menten, tal como ilustrado no gráfico (c) da figura 3.9. Importa referir que o desvio padrão foi muito baixo sobretudo para concentrações de nitrito mais baixas. Os dados experimentais foram ajustados a uma curva hiperbólica (equação 3.1), através da qual se determinou o valor da constante de Michaelis-Menten aparente e da densidade de corrente máxima, obtendo-se um $K_M^{app} = 94 \pm 11 \mu M$ e um $-j_{max} = 81 \pm 3 \mu A \cdot cm^{-2}$.

$$-j_{cat} = \frac{-j_{max} \times [S]}{K_M^{app} + [S]} \quad \text{equação 3.1}$$

O valor obtido para a constante de Michaelis-Menten com o sistema PGE/ccNiR foi mais elevado do que o reportado na literatura, $K_M^{app} = 7 \mu\text{M}^{55}$, para a enzima imobilizada neste tipo de material de eletrodo. Contudo, o aumento do valor da constante de Michaelis-Menten aparente, é devido à limitação do transporte de massa, que no estudo reportado na literatura é diminuído ao utilizar um eletrodo rotativo, ao invés de um eletrodo estacionário. O intervalo de linearidade para a quantificação de nitrito, está compreendido entre 1 a 102 μM (figura 3.9 (c)). Uma vez que o declive da reta corresponde à sensibilidade do biossensor, obteve-se para este parâmetro um valor de $0,43 \pm 0,01 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (tabela 3.4). Este valor é ligeiramente mais elevado ao reportado na literatura, cerca de $0,333 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-256}$.

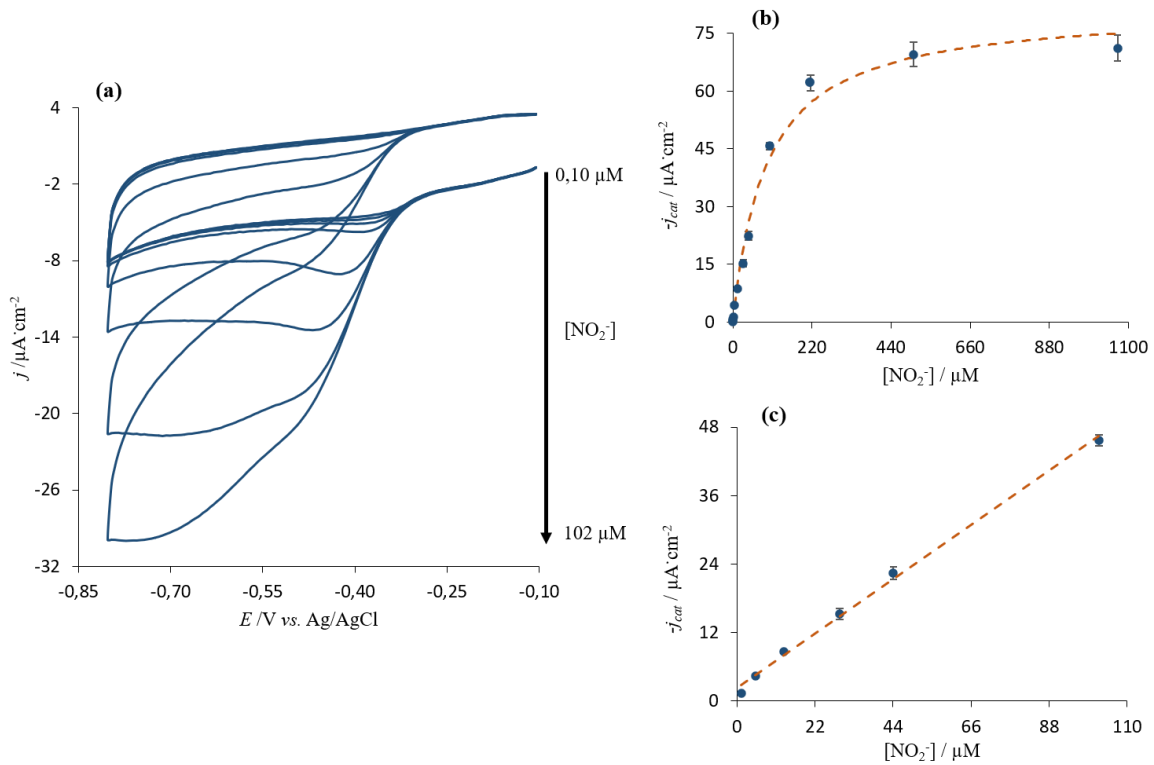


Figura 3.9: (a) Voltamogramas cíclicos obtidos para a enzima ccNiR (3,75 μg) imobilizada na superfície do eletrodo PGE *edge*. Concentrações de nitrito compreendidas entre 0,10 μM a 102 μM . Varrimento do potencial de $-0,1$ a $-0,8$ V com uma velocidade de 20 mV/s. Célula eletroquímica desarejada com argon; (b) Perfil cinético de Michaelis-Menten da enzima ccNiR, entre 0,10 a 1070 μM de nitrito; Resultados obtidos duplicado. A partir dos dados experimentais ajustados para curva hiperbólica com $-j_{cat} = (82 \times [\text{NO}_2^-]) / (94 + [\text{NO}_2^-])$ e $R^2 = 0,991$; (c) Curva de calibração para a quantificação do nitrito compreendida entre 1 a 102 μM de nitrito; $-j_{cat} = 0,43[\text{NO}_2^-] + 2,3$, com $R^2 = 0,997$.

3.2.2. Eléktrods de minas modificados com a enzima ccNiR

Embora se tenha verificado que os eléctrods HBBICPE apresentam um melhor desempenho na transferência eletrónica com o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$, o mesmo não garante que estes sejam os mais adequados para a transdução do sinal bioquímico. Por este motivo, foram também estudados os eléctrods de minas da marca KOH-I-NOOR modificados com a enzima ccNiR na presença de várias concentrações de nitrito, por voltametria cíclica. Como exemplo, apresenta-se, na figura 3.10 (a), os voltamogramas cíclicos na presença de $([\text{NO}_2^-] = 40 \mu\text{M})$. Claramente, o eléctrodo de minas HBBICPE proporcionou os melhores resultados na transdução do sinal bioquímico, pois observou-se um pico catódico nítido a $-0,39 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Com o eléctrodo 3BKOHPE foi também possível ver o sinal catalítico da enzima, embora com um pico mal resolvido. Os eléctrods que apresentaram um comportamento mais resistivo para a transferência eletrónica heterogénea da espécie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$, ou seja, o HBKOHPE e o 3HKOHPE, não mostraram nenhum sinal visível referente ao processo Faradaico (redução da enzima ccNiR). Importa referir que, no caso da mina comercial HBKOHPE, verificou-se por AFM que após a sua lavagem com o eletrólito de suporte, a enzima ccNiR não estava presente na superfície da mina, revelando uma adsorção muito fraca nesta superfície, motivo certamente pelo qual não se observou o sinal catalítico.

Comparando os resultados obtidos com o PGE e o HBBICPE, constata-se que o eléctrodo de minas apresenta uma corrente capacitiva mais elevada do que o PGE, como ilustrado na figura 3.10 (b). Note-se que o procedimento de preparação e limpeza da superfície dos eléctrods de minas, foi diferente do adotado para o PGE. Concretamente, os eléctrods de minas foram polidos na presença de água desionizada, enquanto que no caso do PGE o polimento foi realizado com alumina, que produz uma superfície mais lisa⁹³. O motivo desta diferença prende-se com o facto de que, quando se efetuou o polimento das minas com alumina, e se procedeu seguidamente à modificação da superfície, nos eléctrods de minas HBBICPE, não se verificou a presença de nenhum sinal Faradaico referente à redução da enzima pelo eléctrodo. Está reportado que mesmo após sonicação de um eléctrodo PGE *edge*, em água desionizada ainda é possível observar, por SEM, a presença de alumina na superfície do mesmo⁹³. Considerando que os eléctrods de minas são mais porosos²² do que o PGE a remoção da alumina na superfície deverá ser mais difícil e a sua presença na superfície do eléctrodo deverá interferir com a posterior adsorção da enzima. Num outro estudo foi reportada a necessidade de remover electroquimicamente o excesso de alumina, em eléctrods de minas, usando 100 mM de glicina-NaOH (pH = 10,6) e 0,1 M de KCl entre 0 a + 1,0 V vs. Ag/AgCl⁹⁴. Também o eléctrodo de minas de grafite comercial utilizado na construção do biossensor de nitrito com base na enzima hemoglobina foi polido com lixas e sem alumina, antes de ser modificado^{63,95}.

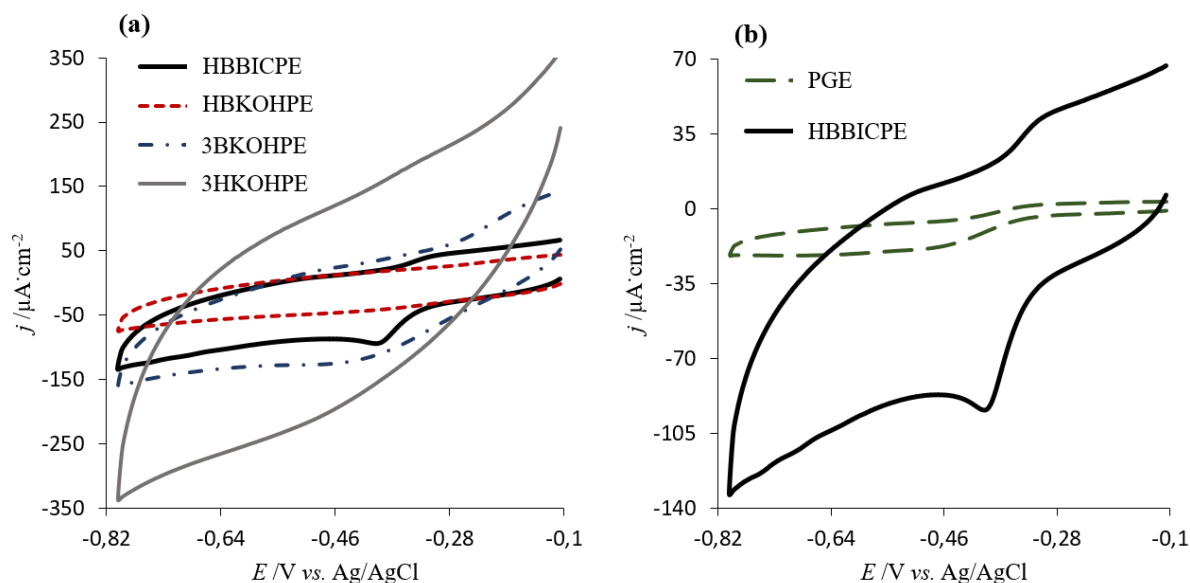


Figura 3.10: Voltamogramas cíclicos obtidos, com o elétrodo de trabalho modificado com a ccNiR, para uma concentração de nitrito de $40\ \mu\text{M}$. Varrimento do potencial entre $-0,1$ a $-0,8\ \text{V}$ com uma velocidade de varrimento de $20\ \text{mV/s}$. **(a)** comparação entre os elétrodos de minas de grafite modificados com $2,25\ \mu\text{g}$ da enzima ccNiR e **(b)** comparação de um PGE (modificado com $3,75\ \mu\text{g}$ de enzima) com o HBBICPE.

Quantificação de nitrito com o elétrodo HBBICPE modificado

Dado o elétrodo HBBICPE ter sido aquele que apresentou um melhor desempenho para a transdução do sinal bioquímico foi o escolhido para o desenvolvimento do biossensor para a detecção de cianeto. Porém, antes de estudar o seu desempenho para a determinação deste inibidor, verificou-se a atividade catalítica da enzima ccNiR, para a redução do nitrito, quando imobilizada na superfície dos elétrodos de minas HBBICPE, previamente caracterizados na secção 3.1. Pelo gráfico (a) da figura 3.11, verificou-se mais uma vez o aumento da densidade de corrente à medida que a concentração de substrato aumenta, caracterizada pelo aparecimento do pico catódico a $-0,32\ \text{V vs. Ag/AgCl}$. À medida que a concentração de nitrito aumenta o valor de potencial de célula desvia-se para valores mais negativos, tal como observado anteriormente. Ao traçar a densidade da corrente do pico catalítico em função da concentração de substrato, verifica-se que a enzima imobilizada segue a cinética de Michaelis-Menten (figura 3.11 (b)). Os ensaios realizados nos três elétrodos de minas em estudo apresentam um desvio padrão baixo, o qual tende a aumentar também para concentrações mais elevadas de substrato. Importa referir que a zona de saturação da enzima ocorre a concentrações mais elevadas de nitrito, contrariamente ao que aconteceu no PGE. Ao ajustar os dados para curva hiperbólica obtém-se valores de $K_M^{App} = 676 \pm 43\ \mu\text{M}$ e $-j_{max} = 652 \pm 74\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. A partir do perfil cinético, obtém-se um intervalo linearidade para a quantificação de nitrito entre 1 a $40\ \mu\text{M}$, tal como ilustrado no gráfico (c) da figura 3.11. A sensibilidade do biossensor, obtida a partir da reta de calibração, corresponde a $1,18 \pm 0,02\ \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, sendo 2,7 vezes mais elevada do que no elétrodo PGE (tabela 3.4).

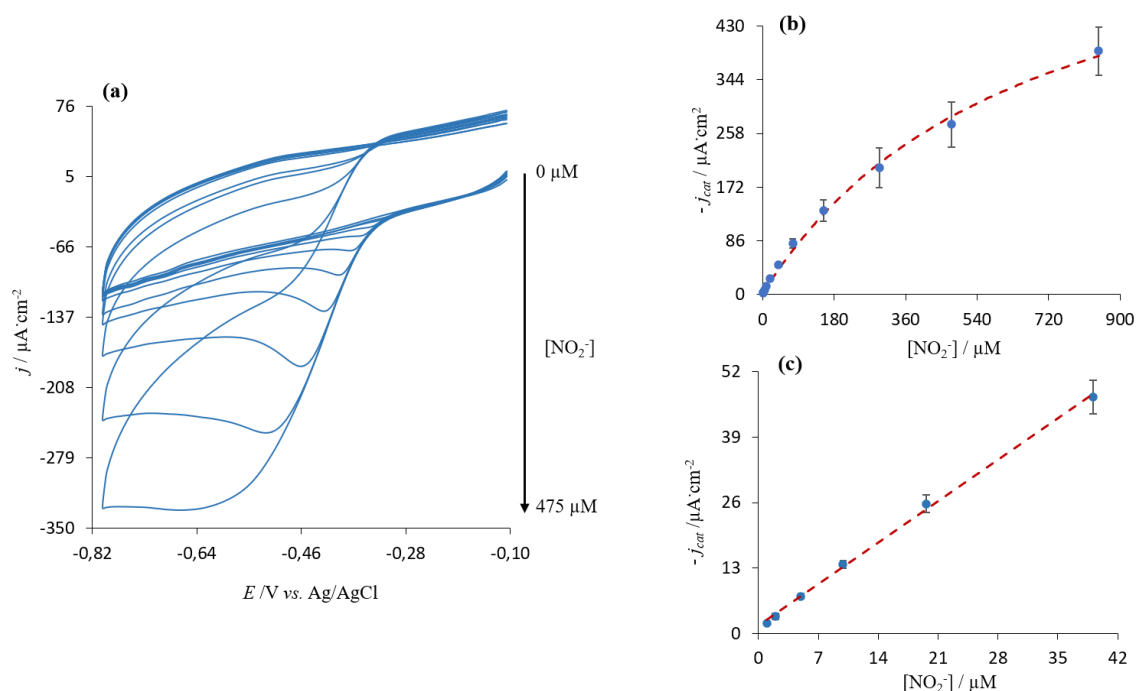


Figura 3.11: (a) Voltamogramas cíclicos obtidos da redução da enzima ccNiR (2,25 μg) imobilizada no eletrodo HBBICPE. Adições sucessivas de nitrito de 1 a 475 μM, velocidade de varrimento 20 mV/s. Célula eletroquímica desarejada com argon. (b) Perfil de Michaelis-Menten para a atividade enzimática obtida a partir modificação dos eletrodos de minas, em triplicado, entre 1 a 846 μM de nitrito; $|j_{cat}| = (676 \times [NO_2^-]) / (652 + [NO_2^-])$. (c) Curva de calibração para a quantificação do nitrito, com um intervalo de linearidade entre 1 a 40 μM. Equação da reta: $-j_{cat} = 1,18[NO_2^-] + 1,4$, $R^2 = 0,999$.

Tabela 3.4: Comparação entre os eletrodos PGE e HBBICPE. Valores obtidos para a constante de Michaelis-Menten, sensibilidade do biossensor, assim como coeficiente de correlação da reta de calibração e respetivo intervalo de linearidade (IL).

	$K_M^{App} / \mu M$	$-j_{max} / \mu A \cdot cm^{-2}$	Sensibilidade $/ \mu A \cdot \mu M^{-1} \cdot cm^{-2}$	R^2	IL $/ \mu M$
PGE	94 ± 11	81 ± 3	$0,43 \pm 0,01$	0,997	1 a 102
HBBICPE	676 ± 43	652 ± 74	$1,18 \pm 0,02$	0,999	1 a 40

3.3. Desempenho do biossensor para detecção de cianeto

Os biossensores enzimáticos de inibição operam a uma concentração fixa de substrato da enzima, estudando-se a diminuição do sinal catalítico em função da concentração de inibidor^{46–50,96}. Em estudos realizados com a ccNiR extraída a partir da *E. coli*, foi comprovado que o cianeto é um inibidor reversível (não competitivo) e apresenta uma maior afinidade com o estado reduzido da enzima⁶⁴. Quando este inibidor se liga à enzima ccNiR, no seu estado reduzido, não permite a formação do catião amónio, e consequentemente a sua re-oxidação, como ilustrado no esquema da figura 3.12. Este efeito traduz-se numa diminuição da corrente catalítica, como está apresentado na figura 3.13.

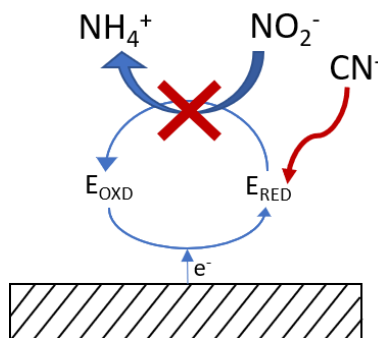


Figura 3.12: Esquema generalizado para a inibição da enzima ccNiR pelo cianeto, considerando a sua afinidade maior para o estado reduzido da enzima.

Para escolher a concentração de nitrito a ser utilizada no biossensor para a detecção de cianetos, estudou-se inicialmente, por CV, o desempenho do biossensor para concentrações de cianeto entre 1 a 475 μM , na presença de quatro concentrações de nitrito diferentes – 5 μM , 10 μM , 20 μM e 40 μM . Para todas as concentrações do substrato, é de salientar que o potencial do pico catalítico, se desviou para valores mais positivos, contrariamente ao que aconteceu na presença de concentrações elevadas de nitrito. No caso de termos 40 μM nitrito, o E_p^c desvia-se de $-0,39\text{ V}$ até $-0,32\text{ V}$ vs. Ag/AgCl , como representado nos voltamogramas (b) da figura 3.13. Esta característica do inibidor é comum também para as redutases do nitrito obtidas a partir da *E. coli*⁶⁴ e da *S. onidensis*. Este fenómeno ocorreu devido ao facto da ligação do cianeto à enzima ccNiR altera o potencial de redução dos grupos hémicos para valores mais positivos⁹⁷. Outro aspeto importante é a perda total da atividade catalítica da enzima em estudo, que é explicado pela presença de dois locais para a ligação do cianeto na ccNiR, sendo o local de ligação desconhecido⁶⁴. Na presença de 40 μM de nitrito, e para uma concentração de cianeto superior a 294 μM a ccNiR perdeu a resposta catalítica na totalidade. Porém, para 5 μM , 10 μM , 20 μM de nitrito a concentração de cianeto para a qual se deixou de verificar a presença do sinal catalítico foi mais baixa, correspondente a 40 μM , 76 μM e 153 μM , respetivamente. Por conseguinte, verificou-se que a concentração de nitrito inicial, (figura 3.13 (a)), influencia a concentração de cianeto conducente à inibição total da enzima.

O perfil de inibição da enzima, representado na figura 3.13 (c), foi traçado através da percentagem de inibição ($\Delta j_{\text{inibição}}$) em função da concentração de cianeto, para as quatro concentrações de substrato estudadas. Os parâmetros da equação da curva hiperbólica (com perfil de inibição) encontram-se apresentados na tabela 6.1, no anexo C. O cálculo da percentagem de inibição foi efetuado a partir da densidade de corrente inicial (j_{cat}), ou seja, do sinal catalítico da enzima para uma determinada concentração de substrato, e da densidade de corrente correspondente à adição de cianeto (j_i)^{7,12,53}, pela seguinte expressão:

$$\Delta j_{\text{inibição}} (\%) = \frac{j_{\text{cat}} - j_i}{j_{\text{cat}}} \times 100\% \quad \text{equação 4.2}$$

De acordo com o perfil de inibição da enzima ccNiR pelo cianeto, comprova-se que a percentagem de inibição não apresenta nenhuma alteração significativa com a variação da concentração de nitrito. Com efeito, considerando que o cianeto é um inibidor não competitivo⁶⁴, e consequentemente não compete com o nitrito pelo centro ativo da enzima, a percentagem de inibição não deve depender da

concentração de substrato¹³. Para os ensaios realizados com 10 μM , 20 μM e 40 μM de nitrito, obtém-se um intervalo de linearidade para a quantificação de cianeto entre 5 a 76 μM , como representado na figura 3.13 (d). Refira-se que para 5 μM de nitrito não foi possível obter uma curva de calibração para a determinação de cianeto, devido ao facto de não apresentar pontos experimentais suficientes nesta gama de concentrações. A sensibilidade do biossensor é independente da concentração de substrato e está compreendida entre 23-25 %, como ilustrado na tabela 3.5. Para calcular o limite de detecção nos biossensores de inibição é geralmente considerado a percentagem de inibição referente a 5%, 10% ou 20%, sendo recomendado a percentagem no valor de 10% de inibição⁹, como implementado nos biossensores de cianeto com a enzima HRP^{49,50}. O limite de detecção obtido para o biossensor de cianeto foi calculado recorrendo a esta metodologia, obtendo-se 4,4 μM , 3,4 μM e 3,7 μM (tabela 4.2), na presença de 10 μM , 20 μM e 40 μM de nitrito, respetivamente. Uma vez que não há diferenças significativos no desempenho do biossensor escolheu-se a concentração de nitrito de 40 μM para ser utilizada nos estudos seguintes, dado a densidade de corrente do pico catalítico ser superior.

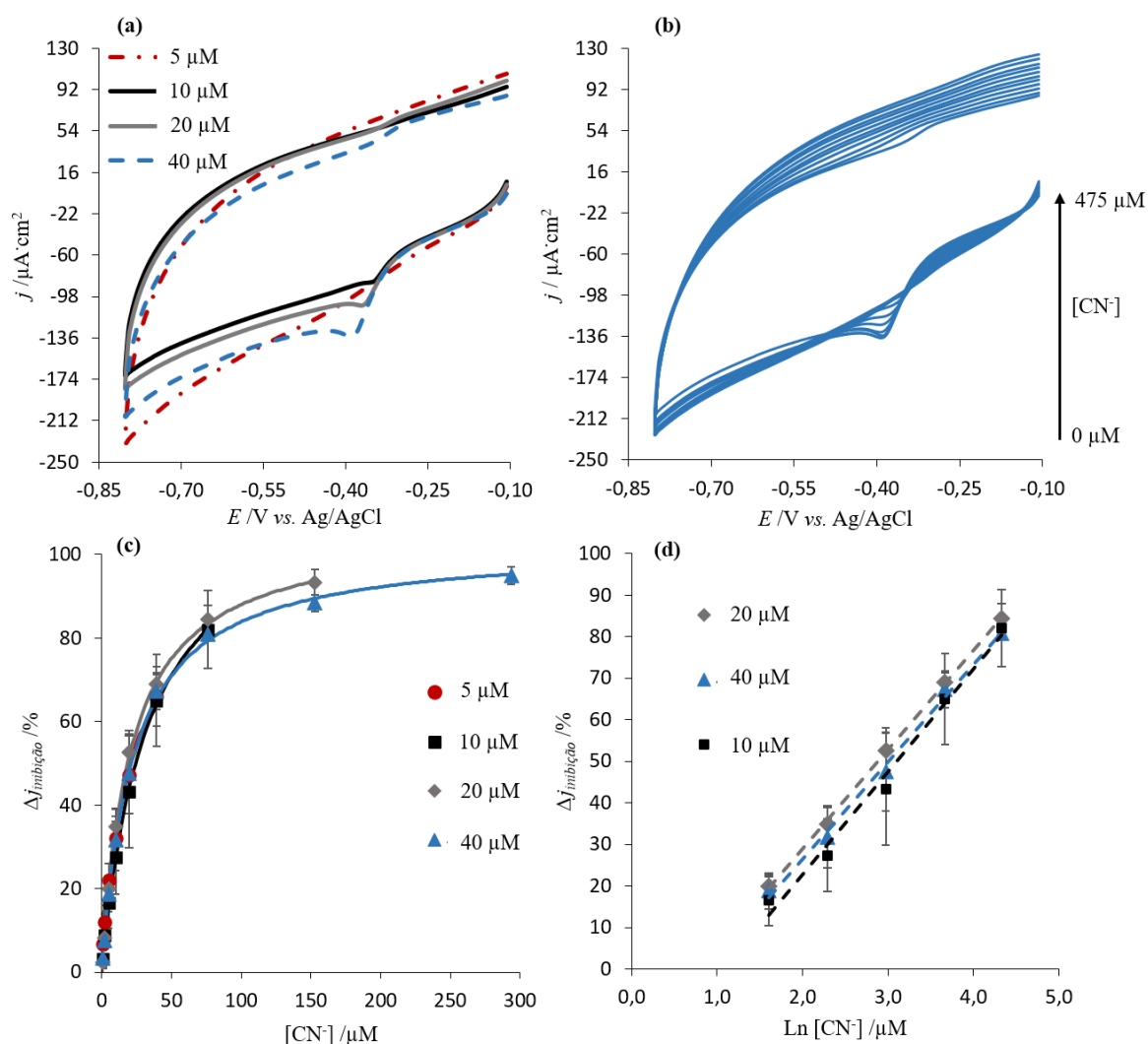


Figura 3.13: Voltamogramas cíclicos obtidos Eléctrodo HBBICPE modificado com 2,25 μg da enzima ccNiR, entre -0,1 a -0,8 V e com uma velocidade de varrimento de 20mV/s. O eletrólito de suporte foi o tampão Tris-HCl e KCl 0,1M, pH=7,6. Desarejamento da célula com argon. Ensaios referentes a quatro concentrações de nitrito diferentes (sem cianeto) (a) e para uma concentração de nitrito de 40 μM , na presença de cianeto entre 1 μM a 475 μM (b). Perfil de inibição para as quatro concentrações de nitrito em estudo, (c). Curvas de calibração para a quantificação de cianeto entre 1 μM a 40 μM , na presença de 10 μM ($\Delta j_{\text{inibição}} = 25 \ln [\text{CN}^-] - 27$; $R^2 = 0,982$), 20 μM ($\Delta j_{\text{inibição}} = 23,8 \ln [\text{CN}^-] - 19$; $R^2 = 0,999$) e 40 μM ($\Delta j_{\text{inibição}} = 23 \ln [\text{CN}^-] - 20$; $R^2 = 0,994$) de nitrito, (d).

Como se verificou por EIS, cada eléctrodo pode apresentar uma interface diferente consoante o seu polimento, o que pode fazer variar, as espécies adsorvidas, originando correntes capacitivas diferentes entre os eléctrodos, mesmo entre replicados. Como exemplo apresenta-se na figura 3.14, os voltamogramas cíclicos dos eléctrodos HBBICPE modificados, antes de cada adição de nitrito. Dado a voltametria de onda quadrada poder minimizar a contribuição desta componente capacitiva^{72,70}, nas correntes medidas, optou-se por esta técnica para o desenvolvimento do biossensor de inibição para a deteção de cianetos.

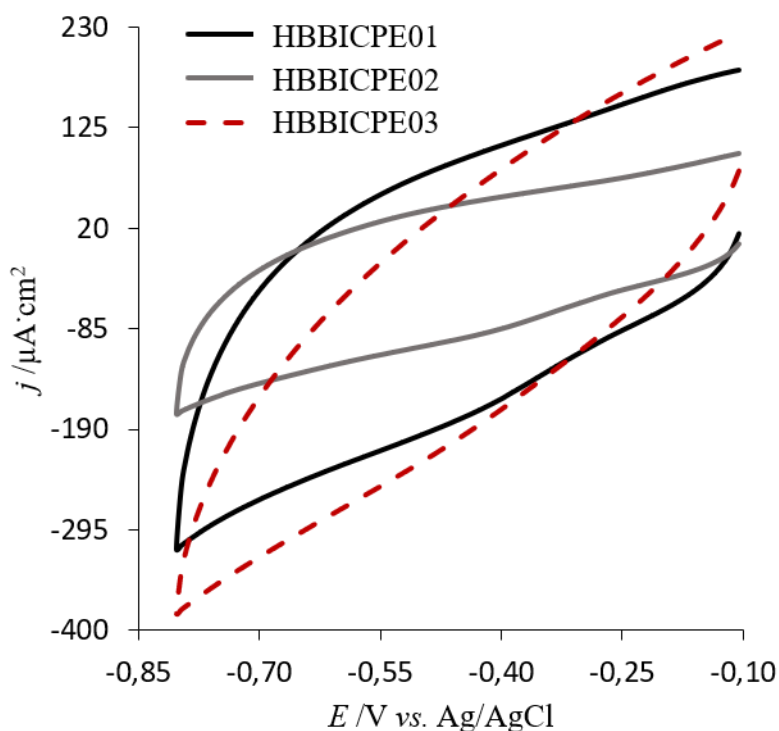


Figura 3.14: Voltamogramas cíclicos referentes aos eléctrodos de minas modificados com a enzima ccNiR, antes da adição de nitrito. Velocidade de varrimento de 20 mV/s, para um potencial entre $-0,1$ a $-0,8$ V, em Tampão Tris-HCl e KCl 0,1M, pH = 7,6. Oxigénio dissolvido removido pelo desarejamento da célula com o gás árgon.

3.3.1. Quantificação de cianeto por voltametria de onda quadrada utilizando um sistema bioquímico para a remoção do oxigénio

De acordo com o descrito na secção 2.2.2 (capítulo 2), o oxigénio dissolvido é um interferente comum na deteção eletroquímica da redução da enzima redutase do nitrito. Com o intuito de construir um biossensor de cianetos que possa ser utilizado no local de amostragem, foi estudado o seu comportamento usando um sistema bioquímico para a remoção do oxigénio na célula eletroquímica. Este método corresponde a um sistema bi-enzimático composto pelas enzimas GOx e catalase, em substituição do sistema de desarejamento da célula eletroquímica com o gás árgon. Como exemplo está representado os voltamogramas obtidos por voltametria de onda quadrada, para o eléctrodo HBBICPE, no gráfico (a) da figura 3.15. Nestes ensaios observou-se igualmente a inibição da enzima: diminuição da densidade de corrente no pico catódico e desvio do potencial para valores mais positivos de $-0,38$ V a $-0,33$ V vs. Ag/AgCl. Curiosamente, ao traçar o perfil de inibição da enzima ccNiR pelo cianeto verificou-se que quando se utiliza o sistema bi-enzimático, a percentagem de inibição da enzima é

superior à observado com a remoção do oxigénio da célula eletroquímica por borbulhamento com o gás árgon (figura 3.15 (b)).

Importa referir que conforme reportado na literatura, a enzima catalase também é inibida pela espécie a analisar, ou seja o cianeto^{98,99}. Por esse motivo, estudou-se, inicialmente por voltametria cíclica, a influência do cianeto no sistema bioquímico de remoção de O₂ com o eléctrodo HBBICPE não modificado, como ilustrado na figura 3.15 (c). Na eventualidade do cianeto inibir a enzima catalase, deveria ocorrer a formação de peróxido de hidrogénio. Este composto seria reduzido na superfície do eléctrodo a um potencial próximo a $-0,58\text{ V vs. Ag/AgCl}^{100}$. Contudo, pelos voltamogramas cíclicos obtidos não se verifica a presença de processos Faradaicos a este potencial, pelo que a enzima catalase não deve estar a ser inibida pelo cianeto. Adicionalmente, se este composto inibisse a enzima catalase, menos moléculas de inibidor estariam disponíveis para inibir a atividade catalítica da redutase do nitrito, o que não resultaria num aumento, mas sim numa diminuição da percentagem de inibição. Consequentemente, o aumento da percentagem de inibição deverá ser explicado pelo facto de o sistema bioquímico GOx/catalase remover melhor o oxigénio presente em solução, comparativamente ao gás inerte. A redutase do nitrito é uma proteína hémica e o oxigénio tem afinidade para proteínas que contêm hemo com um ligando proximal de histidina¹⁰¹, podendo ser reduzido pelas mesmas. Assim, foi possível observar total inibição da enzima com apenas 80 µM de cianeto, no caso do sistema bi-enzimático, ao invés de 150 µM, com o gás árgon. Apesar desta diferença, o intervalo de linearidade não sofreu nenhuma alteração e está compreendido entre 1 a 40 µM de cianeto, como apresentado na figura 3.15 (d). A sensibilidade do biossensor na presença do sistema de enzimas GOx/catalase em solução corresponde a 20,1 %, sendo ligeiramente superior à sensibilidade obtida com o sistema do gás árgon, cerca de 17,6 % (tabela 3.5). Os limites de deteção obtidos foram de 0,86 µM e 0,80 µM, para o sistema bioquímico e com o gás árgon, respetivamente (tabela 3.5), valores ligeiramente inferiores a 1 µM.

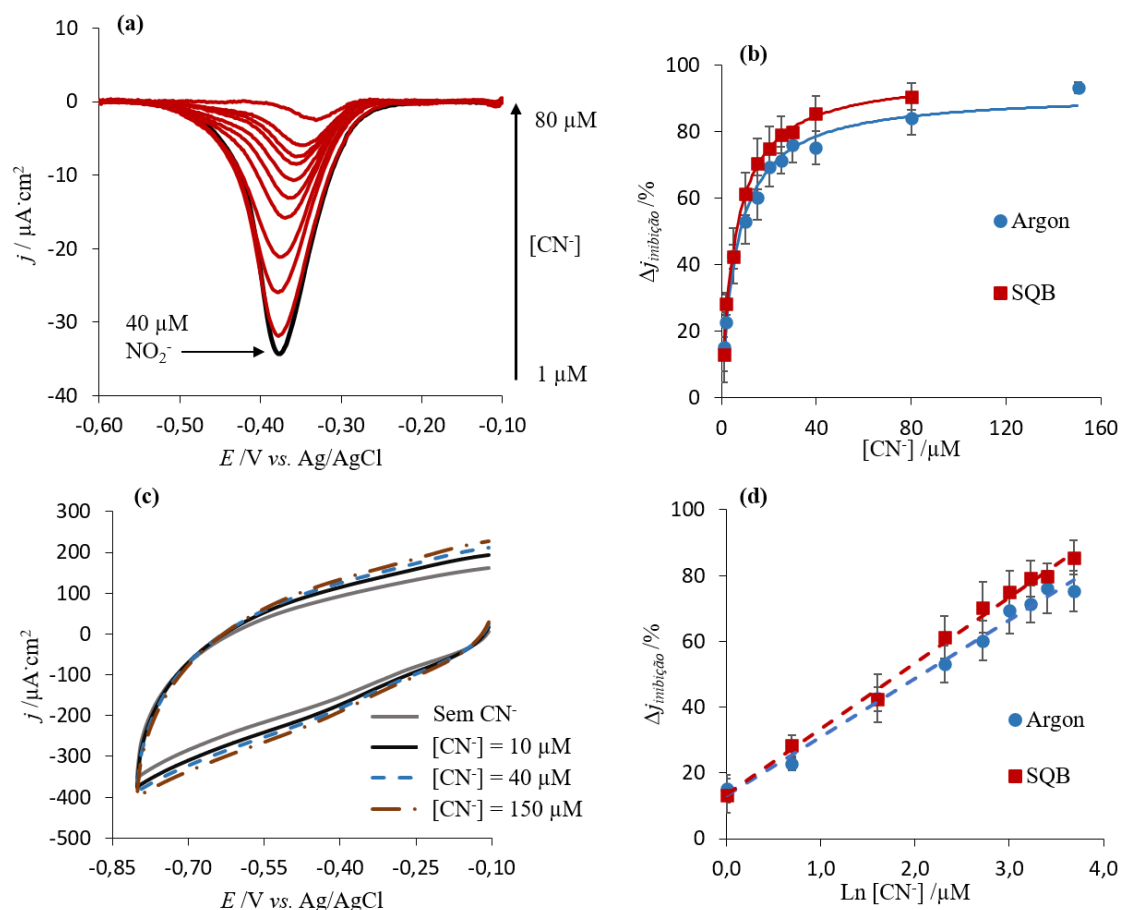


Figura 3.15: (a) voltamogramas obtidos por voltametria de onda quadrada, corrigidos para a linha de base pelo programa *Qsoas*. Amplitude de 0,02 V e frequência de 10 Hz. Adição de cianeto de 1 a 150 μM e remoção do oxigénio pelo sistema bioquímico (GOx, catalase; glucose). (b) Perfil de inibição da enzima ccNiR, com o desarejamento efetuado com árgon e com o sistema bioquímico entre 1 a 150 μM de cianeto, na presença de 40 μM de nitrito. (c) Voltamogramas cíclicos do elétrodo HBBICPE não modificado, com uma velocidade de varrimento de 20 mV/s. Adições de cianeto sem nitrito e remoção do oxigénio com o sistema bioquímico. (d) Intervalo de linearidade para a quantificação de cianeto entre a 1 μM a 40 μM , na presença de 40 μM de nitrito para os dois métodos de remoção de oxigénio. Potencial varrido entre -0,1 a -0,8 V.

Tabela 3.5: Comparação entre as várias técnicas eletroquímicas utilizadas a diferentes concentrações de substrato. Valores obtidos para a sensibilidade do biossensor, assim como os respetivos coeficientes de correlação da reta de calibração, intervalo de linearidade (IL) e limite de deteção estimado (LOD).

Técnica eletroquímica	$[\text{NO}_2^-] / \mu\text{M}$	Sistema de remoção O_2	Sensibilidade /%	R^2	IL / μM	LOD / μM
CV	10	Ar	25 ± 2	0,982	5 a 76	4,4
CV	20	Ar	$23,8 \pm 0,4$	0,999	5 a 76	3,4
CV	40	Ar	23 ± 1	0,994	5 a 76	3,7
SWV	40	Ar	$17,6 \pm 0,7$	0,990	1 a 40	0,80
SWV	40	SBQ	$20,1 \pm 0,6$	0,995	1 a 40	0,86

Mina de grafite comercial como elétrodo de pseudo-referência

Além de serem estudadas como elétrodo de trabalho, as minas de grafite comercial, foram também avaliadas como alternativa ao elétrodo de referência mais comum, ou seja, o elétrodo de Ag/AgCl. Os elétrodos de referência devem apresentar um potencial de equilíbrio estável e bem definido⁶⁸, uma vez que na célula eletroquímica os potenciais são registados como uma diferença relativamente ao elétrodo de referência escolhido¹⁹. Desta forma, o seu potencial não deve ser alterado com a passagem de corrente. No caso do elétrodo de Ag/AgCl utilizado nos ensaios anteriores, um fio de prata está mergulhado numa solução saturada de cloreto de prata, onde ocorre tanto a oxidação como a redução Ag/Ag^+ . A solução saturada está separada do eletrólito da célula eletroquímica através de uma membrana porosa. O mesmo não acontece nos elétrodos de minas, pelo que não podem ser considerados como elétrodos de referência, mas sim como pseudo-referências. Assim, estudou-se o potencial do pico catódico obtido por cada um dos elétrodos de minas - HBBICPE, 3BKOHPE, HBKOHPE e 3HKOHPE - como pseudo-referências no biossensor de cianeto.

Pelo gráfico (a) da figura 3.16, observa-se que o desvio do potencial para valores mais positivos, observado com a adição de cianeto ao eletrólito de suporte, segue o mesmo perfil registado com o elétrodo de referência Ag/AgCl. Os valores de potencial do pico catódico são, porém, bem mais negativos do que estes últimos. Muito importante, o potencial de célula mantém-se constante entre os vários ensaios realizados em triplicado, tal como pretendido. As pseudo-referências HBBICPE e 3BKOHPE apresentam valores de potencial de célula mais próximos entre si. Em relação ao intervalo de linearidade, mantém-se o mesmo entre 1 a 40 μM de cianeto, figura 3.16 (b). A regressão linear apresenta bons coeficientes de correlação (0,991-0,997), como apresentado na tabela 3.6. Além do mais, a sensibilidade obtida para cada biossensor de cianetos, com a mina de grafite comercial como pseudo-referência, está compreendida entre 19,8 % - 20,6 % (tabela 4.3) sendo estes valores comparáveis com o obtido para o biossensor com a referência de Ag/AgCl ($20,1 \pm 0,6$ %). O limite de detecção é inferior a 1 μM , para o biossensor com as pseudo-referências HBBICPE, HBKOHPE e 3BKOHPE, e igual a 1 μM com a pseudo-referência 3HKOHPE. Uma vez que as pseudo-referências não apresentam grandes diferenças entre elas, com a exceção da 3HKOHPE, ao nível comercial seria mais pratico utilizar os elétrodos provenientes todos da mesma marca, razão pela qual o elétrodo HBBICPE, como pseudo-referência foi o escolhido.

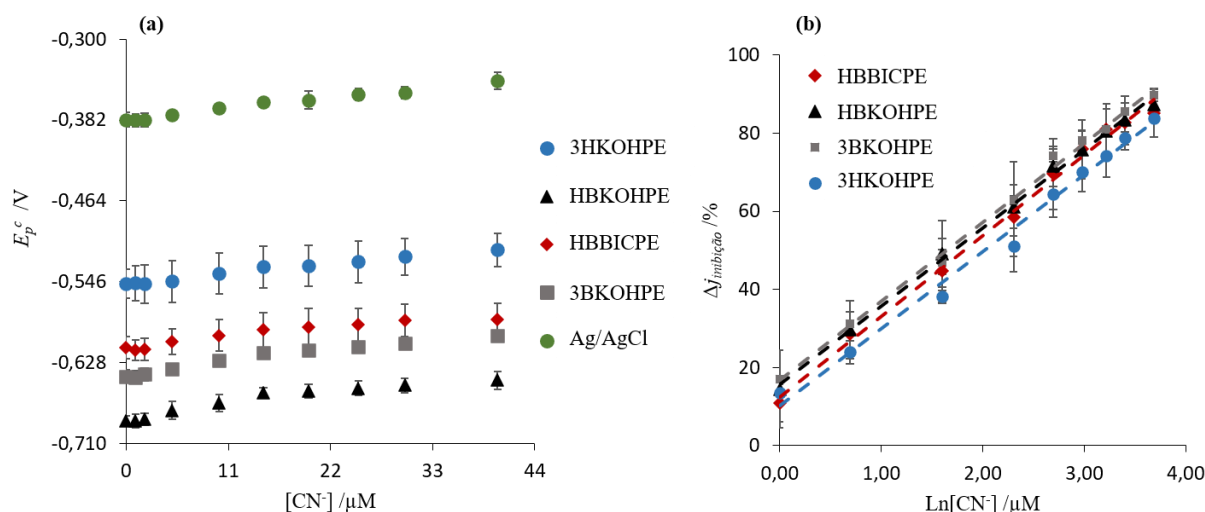


Figura 3.16: Potencial do pico catódico em função da concentração de cianeto, obtido por voltametria de onda quadrada. Adições de cianeto entre 1 μM a 40 μM (a). Intervalo de linearidade entre 1 μM a 40 μM para quantificação de cianeto com os elétrodos de minas como pseudo-referência. Resultados obtidos pela média de triplicados nos elétrodos HBBICPE com o elétrodo de referência Ag/AgCl e com os elétrodos de minas como pseudo-referências, na presença de 40 μM de nitrito. (b). O oxigénio foi removido pelo sistema bi-enzimático

Tabela 3.6: Comparação entre os diferentes elétrodos de minas utilizados como pseudo-referências, para uma concentração de nitrito de 40 μM . Valores obtidos para a sensibilidade do biossensor, assim como os respetivos coeficientes de correlação das retas de calibração e limite de deteção (LOD).

RE	Sensibilidade /%	R^2	LOD / μM
HBBICPE (-0,23 V Ag/AgCl)	$20,6 \pm 0,6$	0,994	0,86
HBKOHPE (-0,31 V Ag/AgCl)	$20,0 \pm 0,5$	0,996	0,74
3BKOHPE (-0,26 V Ag/AgCl)	$20,3 \pm 0,4$	0,997	0,71
3HKOHPE (-0,17 V Ag/AgCl)	$19,8 \pm 0,7$	0,991	1,0

Capítulo 4:

Conclusões e perspectivas futuras

4. Conclusões e perspectivas futuras

Entre as várias minas de grafite comercial testadas para o desenvolvimento de um novo biossensor de cianetos baseado na inibição da enzima multihémica redutase do nitrito, ccNiR, o elétrodo HBBICPE foi aquele que apresentou, não só uma transferência eletrônica mais eficiente para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ - considerando a separação dos picos de redução e oxidação (ΔE_p) e o valor das resistências à transferência de carga (R_{ct}) – como também, foi a mina onde se observou um pico catalítico mais nítido e intenso relativo à redução do nitrito pela enzima ccNiR, imobilizada por adsorção na sua superfície. Assim, provou-se com êxito a aplicabilidade das minas de grafite HB da BIC como transdutores em biossensores enzimáticos de baixo custo.

O biossensor desenvolvido permitiu não só a quantificação de nitrito, como também a quantificação de cianeto. Recorrendo à técnica de voltametria cíclica obteve-se um intervalo de linearidade para a quantificação de nitrito entre 1 a 40 μM , que compreende a concentração de nitrito imposta pela EU em águas (2,2 μM^{59}). No caso do analito ser o cianeto, é possível quantificá-lo no intervalo de concentrações de 1 a 40 μM pela técnica de voltametria de onda quadrada, valores mais baixos do que aqueles que foram obtidos com a técnica de voltametria cíclica (5 a 76 μM). Importa salientar que para além do baixo custo e da sensibilidade que apresenta, este biossensor pode ser aplicado para análises, no próprio local de amostragem, devido à implementação de um sistema bi-enzimático para a remoção do oxigénio dissolvido (interferente). Este sistema não alterou o intervalo de linearidade do biossensor de cianetos, permitindo a sua quantificação dentro dos limites impostos pela EU em águas de consumo (1,92 μM^{32}) e minerais (2,69 μM^{33}).

De entre os materiais de carbono que têm vindo a ser investigados como pseudo-referências, salientam-se os de carbono poroso (mistura de carvão ativado com *carbon black*)¹⁰², ou lápis de grafite modificados com prata e cloreto de prata por deposição eletroquímica¹⁰³. Até à data, não se encontrou nenhum biossensor que descreva a utilização de minas de grafite comercial como pseudo-referência, sendo o elétrodo de referência nos biossensores de cianeto (tabela 1.2) correspondente a um elétrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}^{45,47,48,50-53}$ ou a um elétrodo $\text{SCE}^{46,49}$. Ao incorporar no biossensor as minas de grafite como pseudo-referências, obteve-se uma alternativa viável ao elétrodo de referência comum. Desta forma, foi desenvolvido um sistema de monitorização de muito baixo custo, considerando que cada mina é adquirida por um preço de 0,35 € (uma embalagem de seis minas custa 2,09 €).

Futuramente, espera-se desenvolver um equipamento de monitorização com o sistema de elétrodos (trabalho, pseudo-referência e contra) composto na sua totalidade por minas de grafite comercial. Para tal, será necessário estudar a reprodutibilidade das minas provenientes de vários lotes. Caso a aplicação final vise a reutilização do biossensor mais do que uma vez, será indispensável otimizar o método de imobilização e estudar a estabilidade da enzima imobilizada, nas condições de armazenamento. No final, o biossensor deverá ser estudado para a sua aplicação em amostras reais (água e alimentos) e validado com métodos padrão.

5. Referências

- (1) Ronkainen, N. J.; Brian, H.; Heineman, W. R. Electrochemical Biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747–1763.
- (2) Karunakaran, C.; Rajkumar, R.; Bhargava, K. Introduction to Biosensors. In *Biosensors and Bioelectronics*; Karunakaran, C., Bhargava, K., Benjamin, R., Eds.; Elsevier Inc., 2015; pp 1–68.
- (3) Monteiro, T.; Almeida, M. G. Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited : Old Solutions for New Problems. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2019**, *49*, 44–66.
- (4) Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 635–659.
- (5) Zhang, W.; Li, G. Third-Generation Biosensors Based on the Direct Electron Transfer of Proteins. *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 603–609.
- (6) Das, P.; Das, M.; Chinnadayala, S. R.; Manoj, I. Recent Advances on Developing 3rd Generation Enzyme Electrode for Biosensor Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 386–397.
- (7) Rotariu, L.; Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N.; Bala, C. Electrochemical Biosensors for Fast Detection of Food Contaminants - Trends and Perspective. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 80–87.
- (8) Navaee, A.; Salimi, A. Enzyme-Based Electrochemical Biosensors. In *Electrochemical Biosensors*; Ensafi, A. A., Ed.; Elsevier Inc., 2019; pp 167–211.
- (9) Amine, A.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. Recent Advances in Biosensors Based on Enzyme Inhibition. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *76*, 180–194.
- (10) Justino, C. I. L.; Freitas, A. C.; Pereira, R.; Duarte, A. C.; Rocha, T. A. P. Recent Developments in Recognition Elements for Chemical Sensors and Biosensors. *Trends Anal. Chem.* **2015**, *68*, 2–17.
- (11) House, J. E. *Principles of Chemical Kinetics*, Second.; Academic Press, 2007.
- (12) Sheo, L.; Upadhyay, B.; Verma, N. Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 225–241.
- (13) Arduini, F.; Amine, A. Biosensors Based on Enzyme Inhibition. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2014**, *140*, 299–326.
- (14) Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G. Enzyme Inhibition-Based Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1405–1423.
- (15) Evtugyn, G. A.; Budnikov, H. C.; Nikolskaya, E. B. Sensitivity and Selectivity of Electrochemical Enzyme Sensors for Inhibitor Determination. *Talanta* **1998**, *46*, 465–484.
- (16) Eggins, B. R. *Chemical Sensors and Biosensors*; John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- (17) Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-bouvier, B. D. Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511.
- (18) Paper, R. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8*, 1400–1458.
- (19) Oliveira Brett, A. M.; Brett, C. M. A. *Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações*; Livraria Almedina, 1996.

-
- (20) Mccreery, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *108*, 2646–2687.
 - (21) Rodrigues, S.; Marques, M.; Suárez-Ruiz, I.; Camean, I.; Flores, D.; Kwiecinska, B. Microstructural Investigations of Natural and Synthetic Graphites and Semi-Graphites. *Int. J. Coal Geol.* **2013**, *111*, 67–79.
 - (22) Torrinha, Á.; Amorim, C. G.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Araújo, A. N. Biosensing Based on Pencil Graphite Electrodes. *Talanta* **2018**, *190*, 235–247.
 - (23) David, I. G.; Popa, D.; Buleandra, M. Pencil Graphite Electrodes: A Versatile Tool in Electroanalysis. *J. Anal. Methods Chem.* **2017**, *2017*, 1–22.
 - (24) Randviir, E. P.; Banks, C. E. The Latest Developments in Quantifying Cyanide and Hydrogen Cyanide. *Trends Anal. Chem.* **2015**, *64*, 75–85.
 - (25) Kirman, C. R.; Belknap, A. M.; Webster, A. F.; Hays, S. M. Biomonitoring Equivalents for Cyanide. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *97*, 71–81.
 - (26) Wang, F.; Wang, L.; Chen, X.; Yoon, J. Recent Progress in the Development of Fluorometric and Colorimetric Chemosensors for Detection of Cyanide Ions. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4312–
 - (27) Jackson, R.; Logue, B. A. A Review of Rapid and Field-Portable Analytical Techniques for the Diagnosis of Cyanide Exposure. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *960*, 18–39.
 - (28) Pati, P. B. Organic Chemodosimeter for Cyanide: A Nucleophilic Approach. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *222*, 374–390.
 - (29) Shamsipur, M.; Karimi, Z.; Amouzadeh Tabrizi, M. A Novel Electrochemical Cyanide Sensor Using Gold Nanoparticles Decorated Carbon Ceramic Electrode. *Microchem. J.* **2017**, *133*, 485–489.
 - (30) Ma, J.; Dasgupta, P. K. Recent Developments in Cyanide Detection: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 117–125.
 - (31) Logue, B. A.; Hinkens, D. M.; Baskin, S. I.; Rockwood, G. A.; Logue, B. A.; Hinkens, D. M.; Baskin, S. I.; Rockwood, G. A.; Logue, B. A.; Hinkens, D. M.; et al. The Analysis of Cyanide and Its Breakdown Products in Biological Samples. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2010**, *40*, 122–147.
 - (32) Union, C. of the E. Council Directive 98/83/EC. *Official Journal of the European Communities*, 1998, L 330/32–L 330/54.
 - (33) Communities, C. of the E. Commission Directive 2003/40/EC. *Official Journal of the European Union*, 2003, L 126/34–L 126/39.
 - (34) Mak, K. K. W.; Yanase, H.; Renneberg, R. Cyanide Fishing and Cyanide Detection in Coral Reef Fish Using Chemical Tests and Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2581–2593.
 - (35) APHA Method 4500-CN: Standard Methods for the examination of water and wastewater <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/apha.method.4500-cn.1992.pdf> (accessed Jun 17, 2019).
 - (36) Bark, L. S.; Higson, H. G. A Review of the Methods Available for the Detection and Determination of Small Amounts Of Cyanide. *Analyst* **1963**, *88*, 751–760.
 - (37) Ion-selective electrode, CN <https://www.metrohm.com/en-us/products-overview/60502130#> (accessed Jun 27, 2019).
 - (38) ISE: Cyanide <http://www.vl-pc.com/default/index.cfm/ion-selective/laboratory/ise-cyanide> (accessed Jun 27, 2019).
 - (39) Radiometer Analytical ISE25CN-9 Cyanide Ion Selective Electrode (ISE)
-

<https://www.hach.com/radiometer-analytical-ise25cn-9-cyanide-ion-selective-electrode-ise-half-cell-screw-cap/product?id=7640530892> (accessed Jun 27, 2019).

- (40) Raybuck, S. A. Microbes and Microbial Enzymes for Cyanide Degradation. *Biodegradation* **1992**, 3, 3–18.
- (41) Ketterer, L.; Keusgen, M. Amperometric Sensor for Cyanide Utilizing Cyanidase and Formate Dehydrogenase. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 673, 54–59.
- (42) Ikebukuro, K.; Miyata, A.; Cho, S. J.; Nomuraa, Y.; Chang, S. M.; Yamauchi, Y.; Hasebeb, Y.; Uchiyamab, S.; Karube, I. Microbial Cyanide Sensor for Monitoring River Water. *J. Biotechnol.* **1996**, 48, 73–80.
- (43) Nakanishi, K.; Ikebukuro, K.; Hondu, M.; Yarnauchi, Y.; Nornura, Y.; Yokoyurnu, K. Flow-Type Cyanide Sensor Using an Immobilized Microorganism. *Electroanalysis* **1996**, 8, 876–879.
- (44) Filipović-Kovačević, Ž.; Šalamon, D.; Miroslav, M. Cyanide Determination in Fruit Brandies by an Amperometric Biosensor with Immobilised *Saccharomyces Cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 215, 347–352.
- (45) Amine, A.; Alafandy, M.; Kauffmann, J. M.; Pekli, M. N. Cyanide Determination Using an Amperometric Biosensor Based on Cytochrome Oxidase Inhibition. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2822–2827.
- (46) Hu, X.; Leng, Z.; Plant, M. Determination of Cyanide Using a Tyrosinase Amperometric Biosensor with Catechol as Substrate. *Analyst* **1995**, 120, 1555–1557.
- (47) Shan, D.; Mousty, C.; Cosnier, S. Subnanomolar Cyanide Detection at Polyphenol Oxidase/Clay Biosensors. *Anal. Chem.* **2004**, 76 (1), 178–183.
- (48) Shan, D.; Cosnier, S.; Mousty, C. HRP/[Zn–Cr–ABTS] Redox Clay-Based Biosensor: Design and Optimization for Cyanide Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 390–396.
- (49) Wang, S.; Lei, Y.; Zhang, Y.; Tang, J.; Shen, G.; Yu, R. Hydroxyapatite Nanoarray-Based Cyanide Biosensor. *Anal. Biochem.* **2010**, 398, 191–197.
- (50) Ghanavati, M.; Azad, R. R.; Mousavi, S. A. Amperometric Inhibition Biosensor for the Determination of Cyanide. *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, 190, 858–864.
- (51) Tatsuma, T.; Oyama, N. H₂O₂-Generating Peroxidase Electrodes as Reagentless Cyanide Sensors. *Anal. Biochem.* **1996**, 68, 1612–1615.
- (52) Wang, Y. Amperometric Flow-Biosensor for Cyanide Based on an Inhibitory Effect upon Bioelectrocatalytic Reduction of Oxygen by Peroxidase-Modified Carbon-Felt. **2011**, No. 2, 1631–1637.
- (53) Attar, A.; Cubillana-Aguilera, L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Cisneros, J. L. H.; Palacios-Santander, J. M.; Amine, A. Amperometric Inhibition Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Gold Sononanoparticles Immobilized onto Different Electrodes for Cyanide Measurements. *Bioelectrochemistry* **2015**, 101, 84–91.
- (54) Almeida, M. G.; Macieira, S.; Gonc, L. L.; Huber, R.; Cunha, C. A.; Costa, C.; Lampreia, J.; Joa, M. The Isolation and Characterization of Cytochrome c Nitrite Reductase Subunits (NrfA and NrfH) from *Desulfovibrio Desulfuricans* ATCC 27774 Re-Evaluation of the Spectroscopic Data and Redox Properties. *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 3904–3915.
- (55) Almeida, M. G.; Silveira, C. M.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Moura, J. J. G.; Moura, I.; Léger, C. A Needle in a Haystack: The Active Site of the Membrane-Bound Complex Cytochrome c Nitrite Reductase. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 284–288.
- (56) Silveira, C. M. Development of Electrochemical Nitrite Biosensors Using Cytochrome c Nitrite

Reductase from *Desulfovibrio Desulfuricans*, 2011.

- (57) Cunha, C. A.; Macieira, S.; Dias, M.; Almeida, G.; Gonc, L. L.; Costa, C.; Lampreia, J.; Huber, R.; Moura, J. G.; Moura, I.; et al. Cytochrome c Nitrite Reductase from *Desulfovibrio Desulfuricans* ATCC 27774. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17455–17465.
- (58) Almeida, M. G.; Serra, A.; Silveira, C. M.; Moura, J. J. G. Nitrite Biosensing via Selective Enzymes — A Long but Promising Route. *Sensors* **2010**, *10*, 11530–11555.
- (59) Dutt, J.; Davis, J. Current Strategies in Nitrite Detection and Their Application to Field Analysis. *J. Environmental Monit.* **2002**, *4*, 465–471.
- (60) Scharf, M.; Moreno, C.; Costa, C.; Van Dijk, C.; Payne, W. J.; LeGall, J.; Moura, I.; Moura, J. J. G. Electrochemical Studies on Nitrite Reductase towards a Biosensor. *Biochem. Biophys. Res. Communications* **1995**, *209*, 1018–1025.
- (61) Silveira, C. M.; Gomes, S. P.; Araújo, A. N.; Conceic, M.; Todorovic, S.; Viana, A. S.; Silva, R. J. C.; Moura, J. J. G.; Almeida, M. G. An Efficient Non-Mediated Amperometric Biosensor for Nitrite Determination. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2026–2032.
- (62) Monteiro, T.; Gomes, S.; Jubete, E.; Añorga, L.; Silveira, C. M.; Almeida, M. G. A Quasi-Reagentless Point-of-Care Test for Nitrite and Unaffected by Oxygen and Cyanide. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10.
- (63) Majidi, M. R.; Saadatirad, A.; Alipour, E. Pencil Lead Electrode Modified with Hemoglobin Film as a Novel Biosensor for Nitrite Determination. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 1742–1750.
- (64) Gwyer, J. D.; Richardson, D. J.; Butt, J. N. Resolving Complexity in the Interactions of Redox Enzymes and Their Inhibitors: Contrasting Mechanisms for the Inhibition of a Cytochrome c Nitrite Reductase Revealed by Protein Film Voltammetry. *Biochemistry* **2004**, *43*, 15086–15094.
- (65) Gwyer, J. D.; Angove, H. C.; Richardson, D. J.; Butt, J. N. Redox-Trigged Events in Cytochrome c Nitrite Reductase. *Bioelectrochemistry* **2004**, *63*, 43–47.
- (66) Angove, H. C.; Cole, J. A.; Richardson, D. J.; Butt, J. N. Protein Film Voltammetry Reveals Distinctive Fingerprints of Nitrite and Hydroxylamine Reduction by a Cytochrome c Nitrite Reductase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 23374–23381.
- (67) Almeida, M. G.; Silveira, C. M.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Moura, J. G.; Moura, I.; Le, C. A Needle in a Haystack : The Active Site of the Membrane-Bound Complex Cytochrome c Nitrite Reductase. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 284–288.
- (68) Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; Mccarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **2018**, *95*, 197–206.
- (69) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Aplications*, Second edi.; John Wiley & Sons, INC.: New York, 2001.
- (70) Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspetos Teóricos. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 81–89.
- (71) Lovric, M. Square-Wave Voltammetry. In *Electroanalytical Methods*; Sholz, F., Bond, A. M., Compton, R. G., Fiedler, D. A., Inzelt, G., Kahlert, H., Komorsky-Lovric, S., Lohse, H., Lovric, M., Marken, F., et al., Eds.; Springer, Berlin, Heidelberg, 2010; pp 121–145.
- (72) Online, V. A. Analytical Methods Electrochemical Sensing and Biosensing Based on Square Wave Voltammetry. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 2158–2173.
- (73) Plumere, N.; Campbell, W. H. Enzyme-Catalyzed O₂ Removal System for Electrochemical Analysis under Ambient Air: Application in an Amperometric Nitrate Biosensor. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2141–2146.

-
- (74) Lisdat, F.; Schäfer, D. The Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy for Biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1555–1567.
- (75) Bonanni, A.; Loo, A. H.; Pumera, M. Graphene for Impedimetric Biosensing. *Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 12–21.
- (76) Chang, B.-Y.; Park, S.-M. Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2010**, *3*, 207–229.
- (77) Gadegaard, N. Atomic Force Microscopy in Biology : Technology and Techniques A. *Biotech. Histochem.* **2009**, *81*, 87–97.
- (78) Simone, F.; Tomas, Š.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J. Atomic Force Microscopy for Single Molecule Characterisation of Protein Aggregation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *664*, 134–148.
- (79) Holscher, H.; Falter, J.; Schirmeisen, A. Atomic Force Microscopy. In *Characterization of Materials*; Kaufmann, E. N., Ed.; John Wiley & Sons, Inc, 2012; pp 2290–2302.
- (80) Yoshida, A.; Kaburagi, Y.; Hishiyama, Y. Scanning Electron Microscopy. In *Materials Science and Engineering of Carbon: Characterization*; Inagaki, M., Ed.; Elsevier Inc., 2016; pp 71–93.
- (81) Pereira-da-silva, M. D. A.; Ferri, F. A. Scanning Electron Microscopy. In *Nanocharacterization Techniques*; Róz, A. L., Ferreira, M., Leite, F. L., Oliveira, O. N., Eds.; Elsevier Inc., 2017; pp 1–35.
- (82) Louër, D. Powder X-Ray Diffraction, Applications. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Lindon, J. C., Tranter, G. E., Koppenaal, D. W., Eds.; Academic Press, 2017; pp 723–731.
- (83) Iwashita, N. X-Ray Powder Diffraction. In *Materials Science and Engineering of Carbon: Characterization*; Inagaki, M., Ed.; Tsinghua University Press Limited., 2016; pp 7–25.
- (84) X-ray Powder Diffraction (XRD) https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html (accessed Oct 1, 2019).
- (85) Epp, J. X-Ray Diffraction (XRD): Techniques for Materials Characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*; Hubschen, G., Altpeter, I., Tschuncky, R., Herrmann, H.-G., Eds.; Elsevier Ltd, 2016; pp 81–124.
- (86) Skrzypczynska, K.; Kusmierek, K.; Swiatkowski, A.; Dabek, L. The Influence of Pencil Graphite Hardness on Voltammetric Detection of Pentachlorophenol. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, *13*,
- (87) Murray, H. H. Kaolin Applications. In *Applied Clay Mineralogy: Occurrences, Processing and Application of Kaolins, Bentonites, Palygorskite-Sepiolite, and Common Clays*; Murray, H. H., Ed.; Elsevier B.V., 2006; pp 85–109.
- (88) Zegeye, A.; Yahaya, S.; Fialips, C. I.; White, M. L.; Gray, N. D.; Manning, D. A. C. Refinement of Industrial Kaolin by Microbial Removal of Iron-Bearing Impurities. *Appl. Clay Sci.* **2013**, *86*, 47–53.
- (89) Carlos, J.; Segura, F.; Esteban, V.; Cruz, R.; Jesús, J. De; Bueno, P.; Marlem, E.; Ascencio, L.; Legorreta, F. Characterization and Electrochemical Treatment of a Kaolin. *Appl. Clay Sci.* **2017**, *146*, 264–269.
- (90) Kariuki, J. K.; Soc, J. E.; H-h, P.; Kariuki, J. K. An Electrochemical and Spectroscopic Characterization of Pencil Graphite Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **2012**, *159*, 747–751.
- (91) Pajkossy, T.; Jurczakowski, R. Electrochemical Impedance Spectroscopy in Interfacial Studies. *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *1*, 53–58.
-

-
- (92) Macdonald, J. R.; Johnson, W. B. Fundamentals of Impedance Spectroscopy. In *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Application*; Barsoukov, E., Macdonald, J. R., Eds.; John Wiley & Sons, 2005; pp 1–20.
- (93) Blanford, C. F.; Armstrong, F. A. The Pyrolytic Graphite Surface as an Enzyme Substrate: Microscopic and Spectroscopic Studies. *J. Solid State Electrochem.* **2006**, *10*, 826–832.
- (94) Poorahong, S.; Thammakhet, C. Amperometric Sensor for Detection of Bisphenol A Using a Pencil Graphite Electrode Modified with Polyaniline Nanorods and Multiwalled Carbon Nanotubes. *Microchim. Acta* **2012**, *176*, 91–99.
- (95) Majidi, M. R.; Pournaghi-Azar, M. H.; Saadatirad, A.; Alipour, E. Simultaneous Determination of Nitrite and Hydrogen Peroxide Using Hemoglobin Modified Pencil Lead Electrode as a Novel Biosensor: Application to the Analysis of Mother's Milk. *J. Chinese Chem. Soc.* **2015**, *62*, 83–89.
- (96) Kochana, J.; Strzałka, M.; Kozak, J. An Amperometric Tyrosinase Inhibition-Based Biosensor for the Determination of Sulfite in Natural Waters. *Instrum. Sci. Technol.* **2014**, *42*, 532–547.
- (97) Stein, N.; Love, D.; Judd, E. T.; Elliott, S. J.; Bennett, B.; Pacheco, A. A. Correlations between the Electronic Properties of *Shewanella Oneidensis* Cytochrome c Nitrite Reductase (CcNiR) and Its Structure: Effects of Heme Oxidation State and Active Site Ligation. *Biochemistry* **2015**, *54*, 3749–3758.
- (98) Bouyahia, N.; Larbi, M.; Hnaïen, M.; Lagarde, F.; Jaffrezic-renault, N. Impedance Spectroscopy and Conductometric Biosensing for Probing Catalase Reaction with Cyanide as Ligand and Inhibitor. *Bioelectrochemistry* **2011**, *80*, 155–161.
- (99) Stein, K.; Hain, J. Catalase Biosensor for the Determination of Hydrogen Peroxide, Fluoride and Cyanide. *Mikrochim. Acta* **1995**, *101*, 93–101.
- (100) Lu, W.; Luo, Y.; Chang, G.; Sun, X. Synthesis of Functional SiO₂-Coated Graphene Oxide Nanosheets Decorated with Ag Nanoparticles for H₂O₂ and Glucose Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4791–4797.
- (101) Capece, L.; Marti, M. A.; Crespo, A.; Doctorovich, F.; Estrin, D. A. Heme Protein Oxygen Affinity Regulation Exerted by Proximal Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12455–12461.
- (102) Lee, J.; Jäckel, N.; Kim, D.; Widmaier, M.; Sathyamoorthi, S.; Srimuk, P.; Kim, C.; Fleischmann, S.; Zeiger, M.; Presser, V. Porous Carbon as a Quasi-Reference Electrode in Aqueous Electrolytes. *Electrochim. Acta* **2016**, *222*, 1800–1805.
- (103) Dossi, N.; Toniolo, R.; Terzi, F.; Impellizzieri, F.; Bontempelli, G. Pencil Leads Doped with Electrochemically Deposited Ag and AgCl for Drawing Reference Electrodes on Paper-Based Electrochemical Devices. *Electrochim. Acta* **2014**, *146*, 518–524.

6. Anexos

Anexo A: Circuitos AC – conceito de impedância

Uma voltagem puramente sinusoidal pode ser expressa por:

$$V = V_0 \text{sen}(\omega t) \quad \text{equação 7.1}$$

Onde ω ($\omega = 2\pi f$) é a frequência angular. Quando colocamos a voltagem como um vetor em rotação (vetor de fase), o seu comprimento corresponde à amplitude, V_0 , e a sua frequência de rotação a ω . A voltagem, V , em qualquer momento é o componente do vetor de fase projetado num eixo particular (geralmente a 0°). Ao considerar a relação entre a corrente (I) e a voltagem (V), cada um pode ser representado num eixo como um vetor de fase a deslocarem-se à mesma frequência. Como, geralmente, estes componentes não estão em fase, os seus vetores vão estar separados por um ângulo de fase (ϕ). Um dos vetores é considerado como uma referência, em particular o vetor que representa a voltagem, e o ângulo de fase é medido em relação a este vetor.

$$I = I_0 \text{sen}(\omega t + \phi) \quad \text{equação 7.2}$$

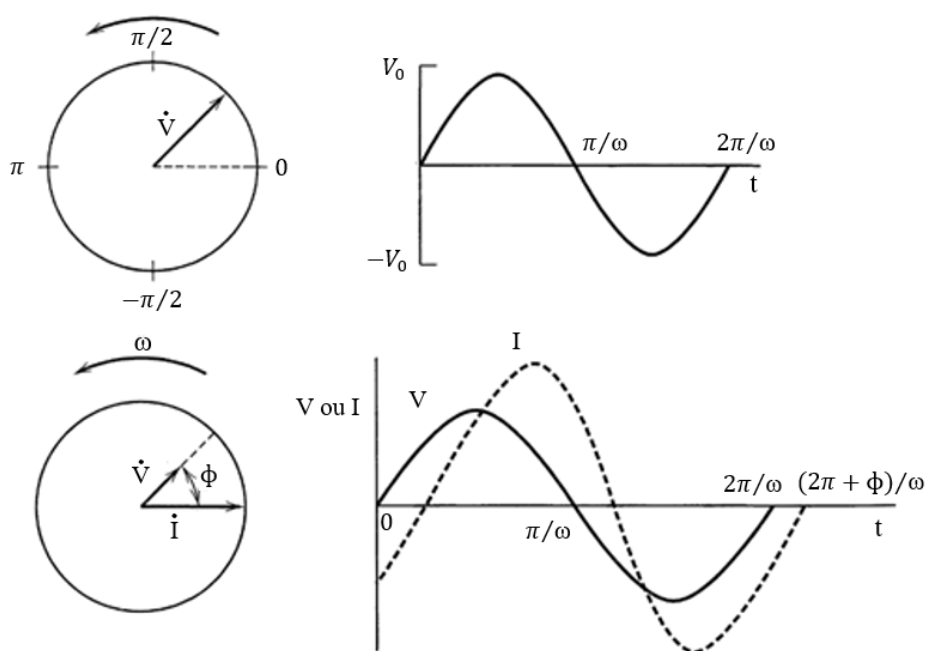


Figura 6.1. a) Diagrama do vetor de fase que ilustra a relação entre a corrente alternada e o potencial alternado $V = V_0 \text{sen}(\omega t)$ imposto ao sistema a uma dada frequência - adaptado da referência ⁽⁶⁹⁾.

A relação entre os dois vetores de fase, na mesma frequência, permanece constante à medida que se deslocam, por isso o ângulo de fase é constante. Se o vetor de fase que é considerado a referência se desloca no diagrama de fase, pode-se estudar a relação entre os vetores, considerando-os com uma origem comum e separados por um ângulo apropriado.

Ao considerar uma voltagem sinusoidal a ser aplicada, numa resistência pura, de acordo com a Lei de ohm, $I = \frac{V_0}{R} \text{sen}(\omega t)$, ou em notação de vetor de fase, $\dot{I} = \dot{V}/R \leftrightarrow \dot{V} = \dot{I}R$. Nesta situação o ângulo de fase é zero, e o diagrama de fase está representado na figura 2.

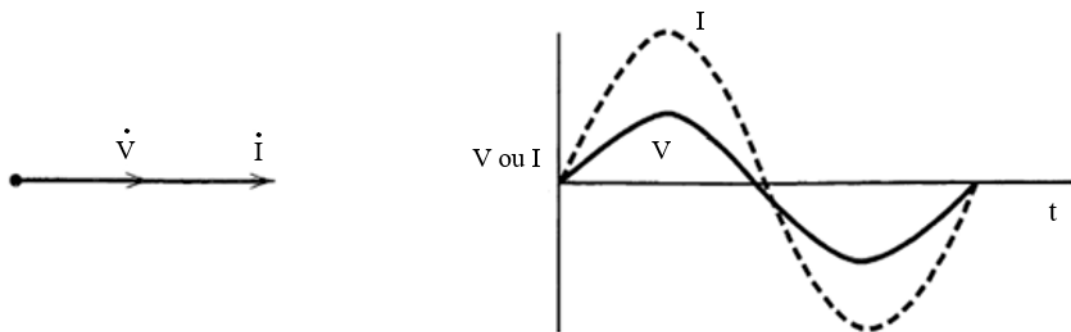


Figura 6.2. Relação entre uma tensão que passa numa resistência e a corrente através da resistência- adaptado da referência ⁽⁶⁹⁾.

Ao substituir a resistência por uma capacitância pura (C), obtêm-se a seguinte relação:

$$q = CV \text{ ou } I = C \frac{dV}{dt} \quad \text{equação 6.3}$$

Ao substituir pela equação 1, obtêm-se:

$$I = \omega CV_0 \cos(\omega t) \quad \text{equação 6.4}$$

$$I = \frac{V_0}{X_C} \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) \quad \text{equação 6.5}$$

Onde $X_C = 1/\omega C$ é a reactância capacitiva e o ângulo de fase é $\frac{\pi}{2}$. Nesta situação é conveniente representar os vetores no plano através da notação complexa. Os componentes na ordenada são considerados imaginários e multiplicados por $j = \sqrt{-1}$. Os componentes na abcissa são considerados reais. Na análise dos circuitos o vetor de fase da corrente é representado na abcissa, mesmo que este parâmetro seja determinado experimentalmente em relação a uma tensão. Desta forma:

$$\dot{V} = -jX_C \dot{I} \quad \text{equação 6.6}$$

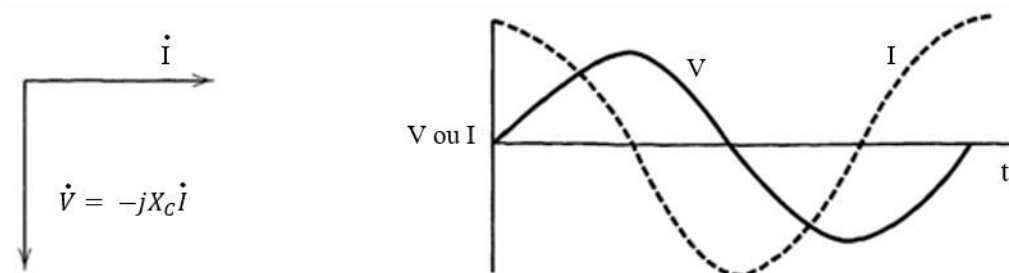


Figura 6.3. Relação entre uma tensão que passa numa capacitância e a corrente através da capacitância - adaptado da referência ⁽⁶⁹⁾.

Ao comparar a equação 6 com a obtida para resistência, o X_C pode ter as mesmas dimensões de R , mas contrariamente ao R , este valor decai com o aumento da frequência. Quando uma tensão V é

aplicada a uma capacidade em série com uma resistência, o seu valor total dever ser igual à soma individual da voltagem que atravessa a resistência e a capacitância, de modo que:

$$\dot{V} = \dot{V}_R + \dot{V}_C \quad \text{equação 6.7}$$

$$\dot{V} = \dot{I} (R - jX_C) \quad \text{equação 6.8}$$

$$\dot{V} = \dot{I} Z \quad \text{equação 6.9}$$

A corrente e a voltagem estão relacionadas através de um vetor $Z = R - jX_C$, o qual se chama de impedância. No geral pode ser representada por:

$$Z(\omega) = Z' - jZ'' \quad \text{equação 6.10}$$

Onde a componente real corresponde a $Z' = R$ e a componente imaginária corresponde a $Z'' = 1/\omega C$ ⁶⁹.

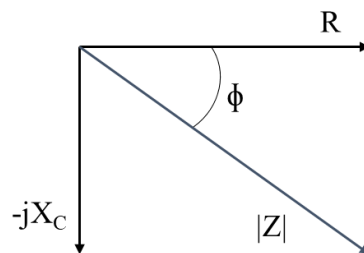


Figura 6.4. Representação do vetor impedância, no plano complexo, que contém as componentes resistivas e capacitiva - adaptado da referência ⁽¹⁹⁾.

Anexo B: Dados experimentais obtidos por EIS para uma grafite policristalina

Resultado obtido por EIS de uma grafite policristalina com $A = 0,88 \text{ cm}^2$ (figura 6.5).

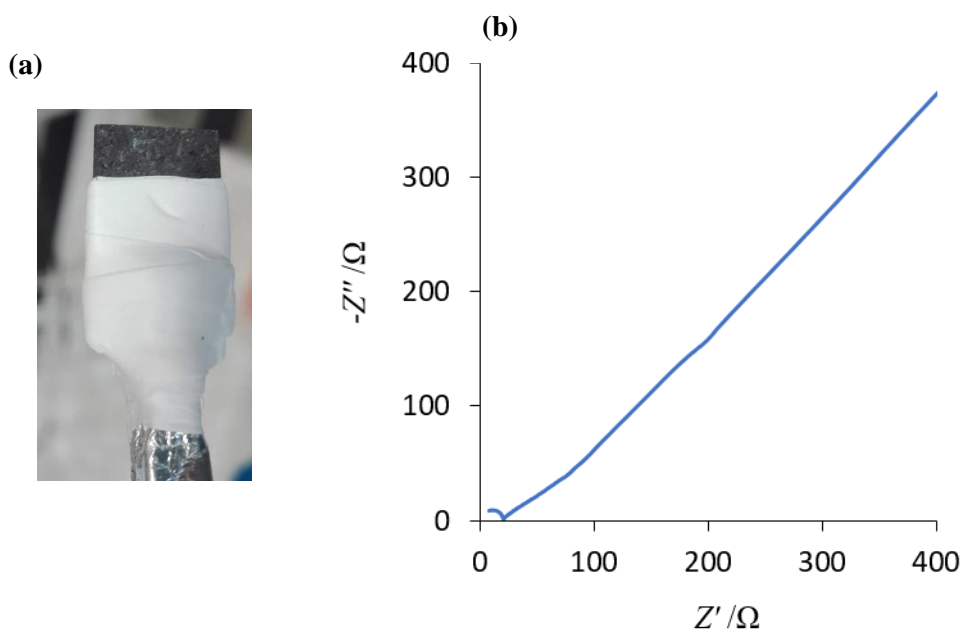


Figura 6.5: (a) Grafite policristalina; (b) Diagrama de Nyquist para a grafite policristalina, para uma frequência de 1×10^5 a $0,005 \text{ Hz}$, no potencial de equilíbrio $0,2 \text{ V}$, em tris- HCl $0,1 \text{ M}$ ($\text{pH} = 7,6$), KCl $0,1 \text{ M}$ e 1 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Anexo C: Resultados obtidos para o ajuste não linear do perfil de inibição

Nesta secção estão apresentados os valores obtidos para a regressão não linear do perfil de inibição da enzima ccNiR pelo cianeto, referente às figuras 4.3 e 4.5. A regressão foi efetuado pelo *software GraphPad Prism 4*, pela equação 6.11. Na literatura não se encontrou um significado físico para as constantes B_{max} e K_d .

$$\Delta j_{inibição} = \frac{B_{max} \times [CN^-]}{K_d + [CN^-]} \quad \text{equação 6.11}$$

Tabela 6.1 – Parâmetros obtidos para uma regressão não linear do perfil de inibição por voltametria cíclica para as quatro concentrações de nitrito, correspondente figura 4.3.

$[NO_2^-] / \mu M$	$B_{max} / \%$	$K_d / \mu M$	R^2
5	94 ± 8	18 ± 3	0,990
10	117 ± 4	33 ± 3	0,998
20	106 ± 2	21 ± 1	0,999
40	102 ± 1	22 ± 1	0,999

Tabela 6.2. Parâmetros obtidos para uma regressão não linear do perfil de inibição por voltametria cíclica, correspondente figura 4.5.

Sistema de remoção O_2	B_{max}	K_d	R^2
Ar	92 ± 7	$6,6 \pm 0,7$	0,986
SQB	97 ± 6	$5,9 \pm 0,3$	0,997